

Aus der Klinik für Innere Medizin  
Schwerpunkt: Nephrologie und Internistische Intensivmedizin  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Hoyer  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

# **Der Einfluss von MicroRNAs auf die Regulation des Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals KCNN4 bei Nierenfibrose**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christoph Mann  
aus Kassel

Marburg, 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am  
10.12.2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. J. Hoyer

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. B. Schmeck

## **Für Orpheas, Elias und alle Neugierigen**

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der  
Philipps-Universität Marburg  
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer  
Creative Commons  
Namensnennung  
Keine kommerzielle Nutzung  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen  
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>10</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>14</b>
1.1 Stroma und Fibroblasten .....	15
1.1.1 Stroma .....	15
1.1.2 Fibroblasten .....	15
1.2 Nierenfibrose .....	17
1.2.1 Myofibroblasten .....	19
1.2.2 Die Herkunft der Myofibroblasten .....	20
1.2.3 Die Rolle der profibrotischen Cytokine .....	22
1.2.3.1 Fibroblast-Growth-Factor – 2 und seine Rezeptoren .....	23
1.3 Kaliumkanäle .....	26
1.3.1 Der <i>intermediate-conductance K<sup>+</sup>-Channel</i> KCCN4 (IK <sub>Ca</sub> 1; IUPHAR: K <sub>Ca</sub> 3.1) .....	27
1.3.2 Die Funktion des KCNN4 .....	29
1.4 MicroRNA .....	31
1.4.1 Entdeckung der MicroRNAs .....	31
1.4.2 Funktion und Biogenese von MicroRNAs .....	32
<b>2. Materialien und Methoden .....</b>	<b>34</b>
2.1 Chemikalien .....	34
2.1.1 Zellkultur .....	34
2.1.2 Profibrotische Stimulation .....	34
2.1.3 Proliverationsversuche .....	34
2.1.4 Elektrophysiologische Untersuchungen (Patch Clamp) .....	34
2.1.5 Genexpression .....	35
2.1.6 MicroRNA Untersuchungen .....	35
2.1.7 MicroRNA Microarray .....	35
2.2 Geräte .....	36
2.3 Methoden .....	36
2.3.1 Zellkultur .....	36
2.3.2 Stimulation mit profibrotischen Zytokinen - in-vitro Fibrosemodell .....	37
2.3.3 Elektrophysiologische Untersuchungen – <i>Patch Clamp</i> .....	39
2.3.4 Proliferationsexperimente .....	42
2.3.4.1 MTT-Proliferationsassay: .....	43

2.3.5	Genexpressionsuntersuchungen – Quantitative real-time PCR	44
2.3.5.1	Methodische und mathematische Grundlagen der quantitativen PCR	44
2.3.5.2	Durchführung der qPCR	48
2.3.6	MicroRNA Untersuchungen	52
2.3.6.1	MicroRNA Expressionarray	53
2.3.6.2	Quantitative, microRNA spezifische, real-time PCR	54
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
3.1	Kanalexpression	61
3.1.1	Molekularbiologische Expressionsuntersuchungen	61
3.1.2	Funktionelle Untersuchung der Kanalexpression – Patch-Clamp	65
3.2	Proliferationsuntersuchungen	68
3.3	Micro-RNA Expression	71
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
4.1	Die Expression des Ionenkanals KCNN4 nach fibrogenem Reiz im in-vitro Fibrosemmodell	79
4.2	Proliferation der Fibroblasten nach mitogener Stimulation	81
4.3	MircoRNA Expressionsuntersuchungen	82
4.4	Regulationshypothese des KCNN4 durch miR-503	96
4.5	Einschränkungen und Ausblick	100
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>106</b>
<b>6.</b>	<b>Summary</b>	<b>108</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>
	<b>Publikation</b>	<b>120</b>
	<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	<b>120</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>122</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: „Bindegewebe vom Schweinsembryo nach längerem Kochen. Grosse, zum Theil isolirte, zum Theil noch in der Grundsubstanz eingeschloissene und anastomosierende Spindelzellen (Bindegewebskörperchen) Große Kerne mit abgelöster Membran; zum Theil geschrumpfter Zelleninhalt. Vergr. 350.“ .....	16
Abbildung 2: Der Herkunft der Myofibroblasten.....	22
Abbildung 3: Pfeildiagramm der tertiären Kristallstruktur der Bindung von FGF-2 und dem Cofaktor Heparin an den FGF-Rezeptor 1 (FGFR1). ....	24
Abbildung 4: Die dem FGF-Rezeptor nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden.....	25
Abbildung 5: Phylogenetischer Stammbaum der Ionenkanäle der VIC-Superfamilie .....	26
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur einer Untereinheit des KCNN4. ....	27
Abbildung 7: Aktivierung des KCCN4 durch Calmodulin .....	28
Abbildung 8: Ablauf der mitogenen Stimulation.....	38
Abbildung 9: Grundlegende Messkonfigurationen bei Patch-Clamp-Untersuchungen.....	40
Abbildung 10: Reduktion von MTT zu Formazan.....	43
Abbildung 11: Repräsentative, quantitative real-time PCR. Darstellung der Amplifikationskurven des Zielgens KCNN4 und der endogenen Kontrolle GAP je einer Probe aus der FGF-2- und der Kontrollgruppe.....	47
Abbildung 12: Darstellung des Grenzwertes ( <i>Threshold</i> ) und des Zyklus bei Grenzwertüberschreitung ( <i>cycle of threshold, Ct</i> ). ....	48

Abbildung 13: Cyclothermogramm der quantitativen PCR (schematische Darstellung):	51
Abbildung 14: Repräsentative Gelelektrophorese der Amplifikate von zwei qPCR Proben.	52
Abbildung 15: Schematischer Ablauf des miRNA-Microarrays.	53
Abbildung 16: Schematischer Reaktionsablauf der MicroRNA-Quantifizierung	54
Abbildung 17: TaqMan Sonde	55
Abbildung 18: Förster-Resonanzenergietransfer	56
Abbildung 19: Signaldetektion	57
Abbildung 20: Darstellung der $\Delta C_t$ nach quantitativer real-time PCR der mRNA des KCNN4-Gens bezogen auf die endogene Kontrolle GAPDH	62
Abbildung 21: relative Genexpression des KCNN4 Gens (IKCa1) in der quantitativen real-time PCR	63
Abbildung 22: Vergleich der mittleren, relativen Genexpression des KCNN4-Gens (IKCa1) nach quantitativer real-time PCR	64
Abbildung 23: Messungen der Summenströme durch KCNN4-Kanäle, normiert auf die Zellmembrankapazität	65
Abbildung 24: Originalstromaufzeichnung einer Patch-Clamp Messung: Aktivierung von KCNN4-Kanälen in FGF-2-stimulierten TFBs	66
Abbildung 25: Originalstromaufzeichnung einer Messungen: Aktivierung von KCNN4-Kanälen in TFBs nach Stimulation mit TGF- $\beta_1$ (1ng/ml)	67
Abbildung 26: Mittelwerte der auf die Kapazität normierten Summenströme durch KCNN4-Kanäle nach Stimulation	68
Abbildung 27: Absorptionsdifferenz im MTT-Proliferationsexperiment nach mitogener Stimulation	69

Abbildung 28: Mittlere Absorptionsdifferenz nach Inkubation mit MTT.....	70
Abbildung 29: 1,5 % denaturierendes Agarosegel der für das miRNA-Microarray vorbereiteten RNA-Proben.....	71
Abbildung 30: Ergebnisbaum des microRNA Microarrays. ....	72
Abbildung 31: Darstellung des log zur Basis 2 der relativen Veränderung der Genexpression (FC, <i>foldchange</i> ) der 403 detektierten miRNAs von Kontrollgruppe zur FGF-2-Gruppe in der miRNA-Microarrayuntersuchung.....	73
Abbildung 32: Darstellung der als signifikant expressionsverändert angesehenen miRNAs .....	74
Abbildung 33: Darstellung der $\Delta C_t$ der miR-503 zur endogenen Kontrolle snoRNA202 nach reverser Transkription und quantitativer, micro-RNA spezifischer real-time PCR.....	76
Abbildung 34: Darstellung der mittleren $\Delta C_t$ der miR-503 zur endogenen Kontrolle snoRNA202 nach reverser Transkription mit spezifischen Primern und quantitativer micro-RNA-spezifischer real-time PCR als Vergleich zwischen Kontrollgruppe und FGF-2-Gruppe.....	77
Abbildung 35: Relative Expression der miR-503 nach quantitativer real-time PCR .....	78
Abbildung 36: Bindungsstelle der miR-503 an der 3'UTR des RAF1-Gens .....	86
Abbildung 37: Hypothetische Sekundärstruktur einer in das Argonautenprotein geladenen miRNA .....	87
Abbildung 38: Die möglichen Basenpaarungen der Seedregion und deren durchschnittlich Häufigkeit.....	88
Abbildung 39: Ergebnisse der Bindungsstellenanalyse mit Version 6.2 des TargetScan Algorithmus.....	89



Abbildung 40: Die vorhergesagte Stabilität ( <i>seed-pairing stability, SPS</i> ) der Basenpaarung für die miR-503 .....	90
Abbildung 41: Die Anzahl der vorhergesagten Bindungsstellen im Genom für die miR-503 .....	91
Abbildung 42: Auszug aus dem UCSC-Genomatlas.....	92
Abbildung 43: P <sub>CT</sub> Werte aller Zielgene der miR-503 als Säulendiagramm .....	93
Abbildung 44: Vergleich der vorhergesagten Bindungsstellenanalyse der miR-503 in der RAF1-UTR mit 2 bereits experimentell validierten Bindungsstellen der miR-503 in der untranslatierten Region des CylcinD1-Gens (CCND1-3'-UTR).....	94
Abbildung 45: Basenweise Darstellung der Konservierung der Bindungsstellenregion.....	95
Abbildung 46: Hypothese der Regulation von KCNN4 durch miR-503.....	97
Abbildung 47: Darstellung der Aktivierung nach Wachstumsfaktorbindung.....	98
Abbildung 48: Sequenzvergleich mmu_miR-503 (murin) und hsa_miR-503 (human) .....	100
Abbildung 49: Zielstrukturen der miR-503.....	102

# Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math> Smooth Muscle Actin</i>
Akt	= Proteinkinase B (PKB)
TRAM-34	1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1 <i>H</i> -pyrazole
1-EBIO	1-Ethyl-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -benzimidazol-2-one; 1-Ethylbenzimidazolinone
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
DCEbio	5,6-Dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -benzimidazol-2-one
NS309	6,7-dichloro-1 <i>H</i> -indole-2,3-dione 3-oxime
A	Adenosin
ATP	Adenosintriphosphat
BCL2	B-Cell Lymphoma 2
BK	<i>Big-conductance K<sup>+</sup>-Channel</i> (syn.: KCa1.1, KCNMA1)
BrdU	Bromdesoxyuridin
c.elegans	Caenorhabditis elegans, eine Fadenwurmart
CaM	Calmodulin
CDC25A	<i>Cell Division Cycle 25A</i> - Protein
CKD	Chronische Nierenerkrankung ( <i>chronic kidney disease</i> )
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
ctl	<i>Control</i> , Kontrollgruppe
CUGBP1	CUG Triplet Repeat, RNA-Binding Protein 1. syn.: CELF1 (Elav-Like Family Member 1)
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>
Ct	<i>Cycle of threshold</i>
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CCNE1	Cyclin E1
CDKN1A	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
CDK2	<i>Cyclin-Dependent Kinase 2</i>
CDK6	<i>Cyclin-Dependent Kinase 6</i>
CCND1	<i>Cyclin D3</i>
C	Cytidin
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ( deu: Desoxyribonukleinsäure, DNS)
DAG	Diacylglycerin

dNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
E2F3	E2F Transcription Factor 3
FAM	ein Reporterfarbstoff der 6-Carboxyfluoresceinderviate
EndMT	Endothelial-Mesenchymale Transition
ET-1	Endothelin-1
EIA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
<i>eIF2C2</i>	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 2C, 2</i> ; das humane Homolog des Argonautenproteins
ECM	Extrazelluläre Matrix
FRS2 $\alpha$	<i>Fgf-receptor substrate 2</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
FSP1	<i>Fibroblast Specific Protein 1</i>
FC	<i>Foldchange</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
<i>miRNom</i>	Gesamtheit aller miRNAs eines Organismus
Gab1	<i>GRB2-associated-binding protein 1</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
K <sub>ca</sub>	Gruppe der calciummodulierten, spannungsabhängigen Kaliumkanäle
K <sub>2P</sub>	Gruppe der doppelporigen Kaliumkanäle
K <sub>ir</sub>	Gruppe der einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle
K <sub>v</sub>	Gruppe der spannungsabhängigen Kaliumkanäle
G	Guanosin
IC <sub>50</sub>	Halbmaximale, inhibitorische Konzentration
HIF1 $\alpha$	Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit
IP3	Inositoltrisphosphat
IGF1	Insulin Like Growth Factor 1
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Calciumkonzentration
IK	kurz für: <i>IKCa1</i> , siehe <i>KCNN4</i>

MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
miRNA	MicroRNA
pre-miRNA	<i>MiRNA-Precursor</i> , miRNA-Vorläufermolekül von 60-70 Basenpaaren Länge
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> (syn.: MAP2K, MAPKK)
MAP-K	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
SMAD	Mothers Against DPP Homolog 1
NFQ	nicht-fluoreszierenden Quencher
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NTC	<i>Non Target Control</i> , Kontrolle ohne cDNA in der Polymerasekettenreaktion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS <sup>+/+</sup>	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (mit Calcium und Magnesium)
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PLCg	Phospholipase-C
PI3k	PI-3-Kinase
PDGF <sub>BB</sub>	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i> , Homodimer aus zwei Untereinheiten des Typs Beta
PolyA	<i>poly-Adenosin</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
KCNN4	<i>Potassium intermediate conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4</i>
pri-miRNA	<i>Primary-MicroRNA</i> , ein mehrere Kilobasen langes, frühes Vorläufermolekül einer miRNA
PRMT1	Protein-Arginin-Methyltransferase 1
PKC	Proteinkinase C
H	Proton. Wasserstoffatom
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
Raf1	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i> (oder auch: <i>rat fibrosarcoma</i> )-Protein
Ras	<i>Rat Sarcoma</i> -G-Protein
REST	<i>RE1 Silencing Transcription Factor</i>
RQ	<i>Relative Quantification</i>
R <sub>n</sub>	<i>Reporter normalized</i>

Rb	Retinoblastom Protein
RT	reverse Transkription
RNA	<i>Ribonucleic acid (deu: Ribonukleinsäure, RNS)</i>
RNF31	Ring Finger Protein 31
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
pol II	RNA-Polymerase II
K <sub>Ca</sub> 3.1	<i>siehe KCNN4 (Synonym)</i>
IK <sub>Ca</sub> 1	<i>siehe KCNN4 (Synonym)</i>
SMURF2	SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 2
SK	<i>Small-conductance K<sup>+</sup>-Channels (syn.: KCa2.1-3, KCNN1-3)</i>
Sos	<i>Son of Sevenless-Protein</i>
SD	<i>Standard Deviation, Standardabweichung</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean, Standardfehler des Mittelwertes</i>
S-Phase	<i>Synthese-Phase des Zellzyklus</i>
TA	<i>Target-site Abundance</i>
T	Thymin
TFBs	<i>Tissue FibroBlasts, murine Nierengewebsfibroblasten</i>
TGF- $\beta$ 1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
TIF	tubulointerstitielle Fibrose
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor Alpha
UUO	Unilateral Urethrobstruktion
UTR	Untranslatierte Region
U	Uracil
VEGFA	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>

# 1 Einleitung

Die Inzidenz chronischer Nierenerkrankungen nimmt in den letzten Jahren weltweit zu, inzwischen stellen sie ein globales Gesundheitsproblem dar. In den USA verdoppelte sich in 11 Jahren nahezu die Zahl der Patienten mit einer terminalen Nierenerkrankung, die eine Nierenersatztherapie benötigen von 340.000 (1999) auf 651.000 im Jahr 2010 (Levey *et al.*, 2003). In Europa waren 2002 ca. 360.000 Patienten auf ein Nierenersatzverfahren angewiesen; davon wurden 66% dialysiert, der Rest hatte ein Transplantat erhalten (Lameire *et al.*, 2005). In Deutschland erhielten im Jahr 2014 ca. 70.000 Patienten eine kontinuierliche, ambulante Dialysebehandlung, ca. 25.000 Patienten lebten mit einem funktionierenden Nierentransplantat (Deutsche Gesellschaft für Nephrologie, 2014). Dies entspricht einem Anstieg der Anzahl der Dialysepatienten seit dem Jahr 2000 um jährlich ca. 2,5% - wobei diese Zahlen durch die fehlende systematische Erhebung fehlerbehaftet sein können (Gesundheitsbericht des Bundes (GBE), 2016). Die terminale Nierenerkrankung und die Nierenersatztherapie schränken die Lebensqualität der Betroffenen erheblich ein, verkürzen ihre Lebenserwartung rapide (5-Jahresüberlebensrate <50%) und verursachen zudem immense Kosten (European Renal Association, 2008). Die Grunderkrankungen, die zum Funktionsverlust der Niere führen, sind zwar heterogen, münden jedoch in einer gemeinsamen pathophysiologischen Endstrecke, einem chronisch-entzündlichen Krankheitsprozess, der durch den zunehmenden Ersatz von funktionsfähigem Nierenparenchym durch Bindegewebe (syn. Stroma, s.u.) charakterisiert ist. An dessen Ende steht mit der Nierenfibrose der irreversible Funktionsverlust des Organs, der zur Nierenersatztherapie zwingt. Bisher steht diesen Patienten keine kausale Therapie zur Verfügung, die über das strikte Management der Risikofaktoren wie Blutzucker, Blutdruck oder Diät hinausgeht und beispielweise den Fibrosierungsprozess direkt beeinflusst. Der Erforschung der bisher unzureichend verstandenen pathophysiologischen Mechanismen, die der Nierenfibrose zu Grunde liegen, kommt daher besondere Bedeutung zu.

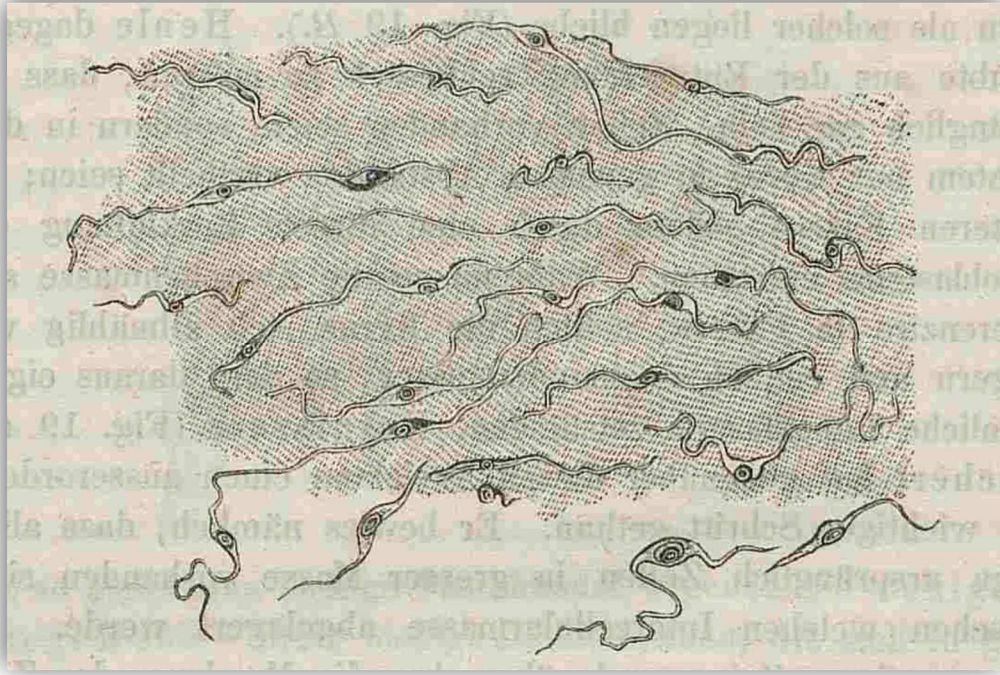
## **1.1 Stroma und Fibroblasten**

### **1.1.1 Stroma**

Bei allen Vertebraten spielt neben den funktionellen Geweben und Organen das Stroma (gr. Στρώμα (stróma) *Lager, Schicht, Bett*) eine entscheidende Rolle in der Architektur und im funktionellen Aufbau des Organismus. Nach heutigem Verständnis geht seine Bedeutung weit über die reine Funktion als bindegewebiges Gerüst für Funktionsgewebe hinaus. Stromazellen interagieren über komplexe Mechanismen mit anderen Zellen und Geweben und üben so entscheidenden Einfluss auf deren Entwicklung, Differenzierung und Funktion aus (Chang *et al.*, 2002). So ist das Stroma nicht nur bei fibrosierenden Erkrankungen wie der Nierenfibrose von entscheidender Bedeutung, sondern zum Beispiel auch bei der Progression maligner Tumoren (Tlsty and Hein, 2001; Kalluri and Zeisberg, 2006) oder bei der Regulation des Gefäßtonus (Kwan *et al.*, 2010). In der Niere bildet das Stroma unter anderem das tubuläre Interstitium, einen Raum der ca. 90% des Nierenvolumens ausmacht. Pathologische Veränderung in diesem Kompartiment können daher rasch zu funktionell relevanten Beeinträchtigungen der Organfunktion führen (Strutz and Neilson, 2003). Das Stroma selbst ist relativ zellarm, es besteht aus einer Ansammlung von extrazellulären Stützproteinen, der sog. extrazellulären Matrix, und den Stromazellen. Physiologischerweise findet sich darunter auch eine kleine Population von spindelförmigen Zellen, den Fibroblasten.

### **1.1.2 Fibroblasten**

Wenngleich die Syntheseleistung von Matrixproteinen von verschiedenen Zellarten erbracht wird, leisten jedoch die Fibroblasten und deren aktivierte Formen - die Myofibroblasten - den größten Anteil daran. Fibroblasten stellen selbst eine sehr heterogene Zellpopulation dar, die ihre genaue Charakterisierung erschwert. Morphologisch wurden sie wahrscheinlich bereits 1859 in Rudolf Virchows *Vorlesungsreihe über die Cellularpathologie* als „spindelförmige Zellen des Bindegewebes“ beschrieben (Virchow, 1859).



**Abbildung 1:** „Bindegewebe vom Schweinsembryo nach längerem Kochen. Grosse, zum Theil isolirte, zum Theil noch in der Grundsubstanz eingeschloissene und anastomosierende Spindelzellen (Bindegewebskörperchen) Große Kerne mit abgelöster Membran; zum Theil geschrumpfter Zelleninhalt. Vergr. 350.“ (Virchow, 1859)

Die Suche nach einem molekularen, fibroblastenspezifischen Marker zur Identifikation der Fibroblasten und gleichzeitigen Abgrenzung anderer Zellarten war bislang nicht erfolgreich. Zwar glaubte man nach der Beschreibung des calciumbindenden *Fibroblast-Specific-Protein-1* (FSP-1, S100A4) durch Strutz und Kollegen (Strutz *et al.*, 1995) einen wirklich fibroblastenspezifischen Marker gefunden zu haben; allerdings musste man wenig später erkennen dass auch dieser seinem Namen nicht gerecht wurde, da er beispielsweise auch von Makrophagen, Lymphozyten oder Tumorzellen exprimiert wird (Cabezón *et al.*, 2007) Daher basiert die molekulare Charakterisierung von Fibroblasten auf einer Kombination verschiedener linienspezifischer Marker bei gleichzeitiger Abwesenheit von Markern anderer Entitäten. Eine Auswahl häufig verwendete Marker zur Identifikation von Fibroblasten ist in Tabelle 1 aufgeführt.



**Tabelle 2:** Marker zur Identifikation von Fibroblasten ( nach **(Kalluri and Zeisberg, 2006))**

Name	Funktion	Coexprimiert in diesen Zelltypen	Kommentar
Vimentin ( <b>Vim</b> )	Intermediärfilamentt	Endothel, Myoepithel, Neuronen	
$\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( <b><math>\alpha</math>-SMA</b> )	Kontraktils Filament	Gefäßmuskelzellen, Pericyten, Myoepithel	bei Myofibroblasten
Fibroblast-Specific-Protein 1 ( <b>FSP-1</b> )	Ca <sup>2+</sup> -bindendes Protein	Macrophagen, Lymphozyten, Carcinomzellen	Syn.:S100A4

Nicht nur die Abgrenzung der Fibroblasten von anderen Zellarten ist komplex, je nach Organsystem finden sich deutliche Unterschiede in den vorliegenden Fibroblastenpopulationen, und auch innerhalb einer Population stellen die Fibroblasten noch eine heterogene Gruppe dar: Beispielsweise unterscheiden sich die Transkriptome von Hautfibroblasten erheblich voneinander je nach dem von welcher Hautstelle sie isoliert worden waren (Chang *et al.*, 2002). Lokale Fibroblastenpopulationen scheinen somit einer ortspezifischen Differenzierung unterworfen zu sein, die ihr Transkriptom und Ihre Syntheseigenschaften an die spezifischen Gegebenheiten unterschiedlicher Milieus anpasst. Im entsprechenden Mikromilieu sind sie so gleichzeitig Hauptsyntheseort der matrixbildenden Proteine wie auch Ursprung matrixdegradierender Proteasen (MMPs, Matrix Metalloproteinasen). Ihre Funktion geht so über die eines einfachen "Faserproduzenten" weit hinaus: Viel mehr sind Fibroblasten Schlüsselakteure bei der Kontrolle des Umsatzes der ECM. (Strutz and Zeisberg, 2006). Dies legt nahe, dass Sie auch bei Zuständen der pathologischen Anhäufung extrazellulärer Matrix, wie der Nierenfibrose, eine Schlüsselrolle einnehmen.

## 1.2 Nierenfibrose

Die Nierenfibrose ist die gemeinsame Endstrecke einer heterogenen Gruppe die Niere schädigender Erkrankungen. Sie wird als ein chronischer, aus heutiger Sicht in der Regel unumkehrbarer Ersatz von funktionsfähigem Gewebe durch Bindegewebe mit einer pathologischen Anhäufung extrazellulärer, fibrillärer Matrixproteine wie Fibronectine und Kollagene der Typen I, III und V, verstanden.

Dies resultiert in zunehmendem Verlust der physiologischen Funktionen der Niere (u.a. Entgiftung, Regulation des Elektrolyt-, des Säure-Basen sowie des Volumenhaushaltes, Hormonsekretion) und mündet in die terminale Niereninsuffizienz mit den oben beschriebenen Folgen für Morbidität und Mortalität. Sie wird als Ergebnis eines fehlgeleiteten Reparaturprozesses verstanden, der nach einem primär schädigenden Reiz und dem vergeblichen Versuch, den physiologischen Zustand wieder herzustellen, in einen Fibrosierungsprozess übergehen kann (Grgic, Duffield and Humphreys, 2011). Bereits mehrmals wurde versucht, den Fibrosierungsprozess zur besseren pathophysiologischen Verständlichkeit in aufeinanderfolgende Phasen zu unterteilen, wobei sich keine der vorgeschlagenen Einteilungen allgemein durchgesetzt hat (Eddy, 2000; Strutz and Neilson, 2003). Eddy hatte bereits 2000 eine willkürliche Einteilung in 4 Phasen vorgenommen. Strutz & Neilson hatten 2003 eine Unterteilung der Nierenfibrose in drei Stadien analog zu den Stadien der Wundheilung vorgenommen, welche in dieser Arbeit Anwendung findet und nachfolgend näher erläutert wird (siehe auch Tab. 3). Demnach kommt es während der *Induktionsphase* in Folge eines primär schädigenden Reizes zur Freisetzung von Chemokinen wie TNF $\alpha$  und Interleukin-1. Diese führen zur Einwanderung von zahlreichen mononukleären Entzündungszellen - vor allem T-Lymphozyten, Monozyten und Macrophagen – ins Interstitium (Muller *et al.*, 1992; Strutz and Neilson, 1994). Auch Mastzellen wandern in die Niere ein (Kondo *et al.*, 2001). In der anschließenden *Entzündungsphase* kommt es zur Freisetzung zahlreicher profibrotischer Zytokine, die zu einer Aktivierung von Fibroblasten, einer erhöhten Fibroblastenproliferationsrate und einer gesteigerten Synthese und Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen führt. Gleichzeitig werden die matrixabbauenden Proteasen durch die Freisetzung von Proteaseinhibitoren (*tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPS)*, *plasminogen activator inhibitors (PAI)*) gehemmt (Eddy, 2000). Die anhaltende Aktivierung des profibrotischen Systems in der *post-entzündlichen Phase* und somit über die Beseitigung des primären Stimulus hinaus charakterisiert die Fibrose und unterscheidet sie von einem erfolgreichen Reparaturprozess mit einer *restitutio ad integrum* (Strutz and Neilson, 2003). Die Faktoren, die diese Stimulation aufrechterhalten, sind noch nicht allumfassend erforscht: Neben direkten Zell-Zell Kontakten und besonderen Milieubedingungen (Hypoxie, Hyperkalziämie, hohe Integrinexpression,

Dysbalance zwischen Proteasen und Proteaseinhibitoren) scheint vor allem die auto- und parakrine Freisetzung der Zytokine (hier vor allem FGF-2 und TGF- $\beta$ 1) durch die aktivierten Fibroblasten selbst eine wichtige Rolle zu spielen.

**Tabelle 3:** Phasen der Nierenfibrose (modifiziert nach **(Strutz and Neilson, 2003)**)

<b>I.</b>	<b>Induktionsphase</b>
•	Chemokinfreisetzung (TNF $\alpha$ , IL-1)
•	Attraktion mononukleärer Entzündungszellen
•	Freisetzung profibrotischer Zytokine
<b>II.</b>	<b>Entzündungsphase</b>
•	Fibroblastenaktivierung (TGF- $\beta$ 1, EGF, ET-1, FGF-2 u.a.) und Proliferation
•	Gesteigerte Matrixsynthese, gestörter Matrixabbau
•	Unterhalt der Entzündung bis entzündlicher Stimulus beseitigt
<b>III.</b>	<b>Post-Entzündliche Phase</b>
•	Primärer Stimulus beseitigt
•	Anhaltende Fibroblastenaktivierung mit Aufrechterhaltung der Matrixsynthese und Proliferation

### 1.2.1 Myofibroblasten

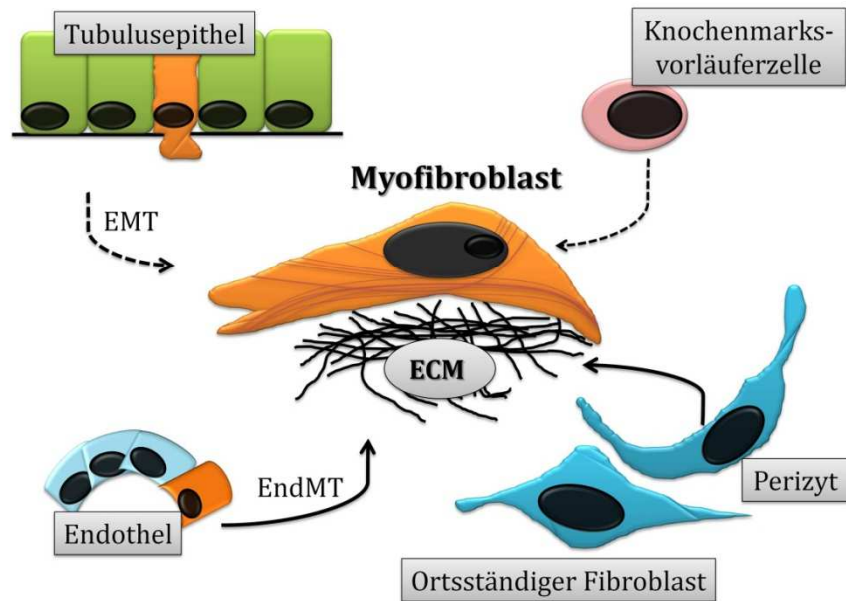
Hat eine profibrotische Stimulation stattgefunden, zeigt sich mit Fortschreiten des Entzündungsprozesses histologisch in erkrankten Nieren eine Population phänotypisch veränderter, aktivierter Fibroblasten oder *Myofibroblasten*, die man in gesunden Nieren nicht findet (Ina *et al.*, 2002). Sie fallen durch die charakteristische Expression des kontraktilen Microfilaments der glatten Muskelzellen, des  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) auf und bilden so eine durch *gap-junctions* verbundene, multizelluläre, kontraktile Einheit (Tomasek *et al.*, 2002). Sie zeigen außerdem eine deutlich erhöhte Prokollagenexpression und werden für die gesteigerte Fasersynthese verantwortlich gemacht (Zhang *et al.*, 1994). Wenngleich nicht alle aktivierten Fibroblasten  $\alpha$ -SMA exprimieren (Okada *et al.*, 2000), ist doch die Anzahl der  $\alpha$ -SMA-exprimierenden Zellen in Nierenbiopsien ein guter prädiktiver Marker für den Grad der tubulointerstitiellen Fibrose (TIF), die wiederum am besten mit dem Ausmaß der Nierenfunktionseinschränkung und der Krankheitsprognose korreliert (Risdon, Sloper and De Wardener, 1968; Hewitson and Becker, 1995; Makni *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Die Herkunft der Myofibroblasten

Der Ursprung dieser in fibrotischen Nieren vermehrt auftretenden Zellen ist hingegen seit langem umstritten. Prinzipiell kommen fünf Varianten als Ursprung dieser Population in Frage: Zunächst ging man nach der Erstbeschreibung der Fibroblasten davon aus, dass sie von hämatopoetischen Vorläuferzellen abstammen und aus dem Knochenmark einwandern. Ross et al. konnten jedoch 1970 in einem vielbeachteten Experiment an verwundeten parabiotischen Ratten zeigen, dass die Fibroblasten in Wunden nicht von hämatopoetischen Vorläufern abstammen und schlussfolgerte daraus, dass sie ortsständigen Ursprungs sein müssen (Ross, Everett and Tyler, 1970). Später erlangte eine neue Hypothese zunehmende Aufmerksamkeit: Man hatte zunächst in Zellkulturexperimenten festgestellt, dass epitheliale Tubuluszellen durch Stimulation mit entsprechenden profibrotischen Wachstumsfaktoren (v.a. TGF- $\beta$ ) zur Expression mesenchymaler Marker (wie  $\alpha$ -SMA) gebracht werden konnten. Daraus entstand die Hypothese, dass auch bei der Fibrose - ähnlich wie bei malignen Erkrankungen beschrieben - eine Transition der epithelialen zu mesenchymalen Zellen stattfinden kann (EMT). Nach dieser Vorstellung würden epitheliale Tubuluszellen die Möglichkeit erlangen, sich zu myofibroblastären Zellen zu entdifferenzieren, durch die Basalmembran ins Interstitium zu migrieren und dort zur Fasersynthese und zur Fibrose beizutragen. Im Jahr 2002 erschien dann eine Untersuchung, in der mit *genetic fate mapping* eine Methode eingesetzt wurde, bei der Zellen in vivo dauerhaft gentechnisch markiert werden um ihre weitere Entwicklung verfolgen zu können. In dieser Arbeit markierten Iwano und Kollegen zunächst epitheliale Tubuluszellen, induzierten anschließend bei den so manipulierten Mäusen eine Nierenfibrose mittels unilateraler Uretherobstruktion (UUO) und untersuchten die aktivierten Fibroblasten. Sie schlussfolgerten, dass der größte Teil der Fibroblasten sich im Rahmen einer *epithelial-mesenchymalen Transition* (EMT) aus den zuvor markierten Tubulusepithelzellen entwickelt hatte. Die anderen Fibroblasten waren ortständigen Ursprungs und ein geringer Teil hatte hämatopoetische Vorläufer (Iwano *et al.*, 2002). Diese Schlussfolgerungen sind jedoch umstritten: Humphreys und Kollegen fanden bei ihren fate mapping Untersuchungen keinen Hinweis darauf, dass bei Tubulusepithelzellen *in vivo* eine EMT stattfindet; wenngleich sie zeigten dass diese Epithelzellen *in vitro* nach entsprechender Stimulation durchaus

mesenchymale Marker exprimieren konnten (Humphreys *et al.*, 2010). Vier andere Arbeitsgruppen konnten in Ihren fate-mapping Studien ebenfalls keinen Hinweis für eine EMT *in vivo* entdecken, so dass nach aktueller Datenlage in Zweifel gezogen werden muss, ob die EMT tatsächlich zum Pool der aktivierten Fibroblasten bei Nierenfibrose beiträgt (Grgic, Duffield and Humphreys, 2011). Anschließend zeigten Humphreys *et al.*, dass eine mesenchymale, perivaskulär liegende Zellpopulation, die Pericyten, als Progenitoren zur Rekrutierung von Myofibroblasten beitragen. Bisher noch nicht erforschte pathophysiologische Mechanismen führen zum Verlust des Endothelkontakts dieser Zellen und zur Migration aus ihrer perivaskulären Nische ins Interstitium, wo die Fasersynthese erfolgt (Humphreys *et al.*, 2010). Als fünfte Variante trat 2008 das Endothel als Ursprung aktivierter Fibroblasten hinzu: Zeisberg und Kollegen zeigten in einer Untersuchung mit 3 Modellen chronischer Nierenfibrose an Mäusen, dass 30-50% der Fibroblasten endotheliale Marker (z.B. CD31) exprimieren. Ebenfalls mittels fate-mapping zeigten Sie anschließend, dass ein Teil der Fibroblasten sich aus markierten Endothelzellen im Sinne einer Endothel-zu-Mesenchym-Transition entwickelte (EndMT) (Zeisberg *et al.*, 2008). Zusammenfassend existiert unterschiedliche Evidenz für jede der beschriebenen Varianten zur Generierung von Myofibroblasten. Konsens herrscht allgemein darüber, dass Zellen aus dem Knochenmark (Fibrocyten) nur einen geringen Teil der Population ausmachen. Ob der Großteil der Fibroblastenpopulation nun Pericyten, ortständigen Fibroblasten, der EndMT oder gar der EMT entstammt, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein und ist lesenswert zusammengefasst in (Grgic, Duffield and Humphreys, 2011) (siehe auch Abbildung 2).

# Die Herkunft der Myofibroblasten



**Abbildung 2:** Der Herkunft der Myofibroblasten. Gezeigt ist ein Myofibroblast und die 5 postulierten Vorläufer des Myofibroblasten (modifiziert nach **Grgic 2011**).

## 1.2.3 Die Rolle der profibrotischen Cytokine

Unabhängig vom Ursprung der Myofibroblasten sind proinflammatorische Cytokine entscheidende Mediatoren bei der Fibroseentwicklung. Von Ihnen wurden zahlreiche als profibrotisch und mitogen für Fibroblasten beschrieben, neben dem am häufigsten erwähnten  $\text{TGF}\beta_1$  (Kopp *et al.*, 1996) werden unter anderem noch FGF-2 (Strutz *et al.*, 2000),  $\text{PDGF}_{\text{BB}}$  (Johnson *et al.*, 1998), aber auch Angiotensin II (Fern *et al.*, 1999) und Endothelin I (Hochoer *et al.*, 1997) als profibrotisch angesehen. In der vorliegenden Arbeit kam neben  $\text{TGF}\beta_1$  hauptsächlich FGF-2 zur Anwendung.

### 1.2.3.1 Fibroblast-Growth-Factor – 2 und seine Rezeptoren

FGF-2 (syn: *basic Fibroblast Growth Factor*, bFGF; *Heparin-Binding Growth Factor 2*, HBGF-2, oder *Prostatropin*) ist ein hochkonservierter Wachstumsfaktor aus der Familie der Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs). FGF-2 defiziente Mäuse zeigen Störungen in der Großhirnentwicklung und der Blutdruckregulation (Hypotonie, (Dono *et al.*, 1998). FGF-2 wirkt mitogen auf zahlreiche Zellarten, neben Fibroblasten auch auf Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen oder Mesangiumzellen (Kriz *et al.*, 1995). Bei der Nierenfibrose nimmt FGF-2 eine Schlüsselrolle ein: Frank Strutz und Kollegen zeigten an Nierenfibroblasten, dass diese nach Stimulation mit TGF $\beta_1$  proliferierten, gleichzeitig aber erhöhte Mengen an FGF-2 ausschütteten. Nach der Zugabe von FGF-2 neutralisierenden Antikörpern kam der proliferationsstimulierende Effekt des TGF $\beta_1$  fast vollständig zum Erliegen. Daraus wird geschlossen dass die Stimulation der Proliferation durch TGF $\beta_1$  größtenteils auf einer auto- und parakrinen Freisetzung von FGF-2 aus den Fibroblasten beruht (Strutz *et al.*, 2001). In der Tat ist die Expression von FGF-2 in fibrotischen Nieren im Vergleich zu gesunden signifikant erhöht. (Strutz *et al.*, 2000) Die Entkopplung dieser autokrinen FGF-2 Freisetzung von TGF $\beta_1$  als einem seiner Triggerfaktoren könnte eine mögliche Erklärung für die bei Fibrose charakteristische, anhaltende Fibroblastenproliferation über den primär inflammatorischen Stimulus hinaus sein.

Seine Wirkung entfaltet FGF-2 über die extrazelluläre Bindung an seinen Rezeptor: Der FGF-2-Rezeptor wurde 1989 isoliert und cloniert (Lee *et al.*, 1989), heute umfasst die Familie der FGF-Rezeptoren vier Mitglieder (FGFR1-FGFR4), die 18 bekannte Liganden binden (Sarabipour and Hristova, 2016). Es handelt sich um transmembranäre Proteine, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Skeletts und insgesamt bei der embryonalen Entwicklung spielen. Daneben wurden Mutationen, Translokationen oder die Überexpression der FGF-Rezeptoren auch in zahlreichen Krebserkrankungen beschrieben (Chesi *et al.*, 1997, 1998; Sarabipour and Hristova, 2016). Die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle der Rezeptoren besteht aus drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Es folgen eine transmembranäre Domäne und ein cytoplasmatischer Teil, der die katalytische Untereinheit – eine Tyrosinkinase – sowie regulatorische Sequenzen enthält. Durch alternatives Splicing entstehen zahlreiche Isoformen, die linienspezifisch

exprimiert werden (Eswarakumar, Lax and Schlessinger, 2005). Nach Bindung des Liganden an die extrazelluläre Bindungsstelle und Dimerisierung zweier Rezeptoren aktivieren sich die intrazellulären Tyrosinkinasedomänen durch Autophosphorylierung.

## Bindung von FGF-2 und Heparin an FGFR1



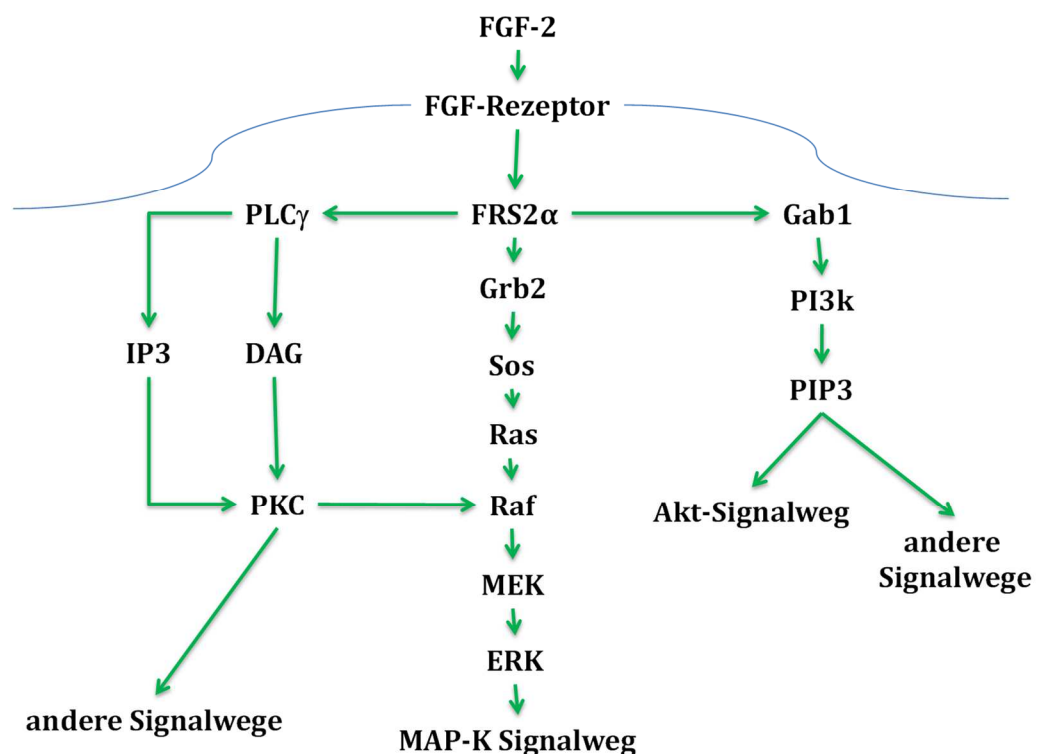
**Abbildung 3:** Pfeildiagramm der tertiären Kristallstruktur der Bindung von FGF-2 und dem Cofaktor Heparin an den FGF-Rezeptor 1 (FGFR1). Gelb: FGF-2. Grün und Blau: die D2 und D3 Domäne der Ligandenbindungsstelle des FGFR1. Rot: Heparin (modifiziert nach (Eswarakumar, Lax and Schlessinger, 2005)).

Darauf folgt die intrazelluläre Signaltransduktion durch die Aktivierung verschiedener Signalwege: Hierzu gehört Phospholipase- $C\gamma$  (PLC $\gamma$ ), die spezifisch über Phosphorylierung an Tyr766 des FGF-Rezeptors aktiviert wird und über IP3 eine Multiproteinkinase, die Proteinkinase C (PKC) aktivieren kann (Eswarakumar, Lax and Schlessinger, 2005). Daneben werden über FRS2 $\alpha$  als zentraler Schaltstelle in der Signaltransduktion weitere Signalkaskaden aktiviert: FRS2 $\alpha$  stellt Bindungsstellen für die Generierung eines Multiproteinkomplexes um Gab1 bereit. Dieser Komplex kann die PI-3-Kinase (*PI-3kinase*, PI3k) aktivieren, die eine Stimulation des anti-apoptotischen Akt-Signalweges bewirkt. Außerdem ist FRS2 $\alpha$



ist in der Lage Grb2/Sos-Komplexe zu rekrutieren, die über Aktivierung von Ras, Raf und MEK die Phosphorylierung von ERK über die gleichnamige Signalkaskade bis zum pro-proliferativen MAP-Kinase-Signalweg (*mitogen-activated-proteinkinase*) stimulieren. Hierdurch werden zahlreiche Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, die die Transkription proliferationsrelevanter Zielgene regulieren.

## FGF-2 Signaltransduktion via FGFR



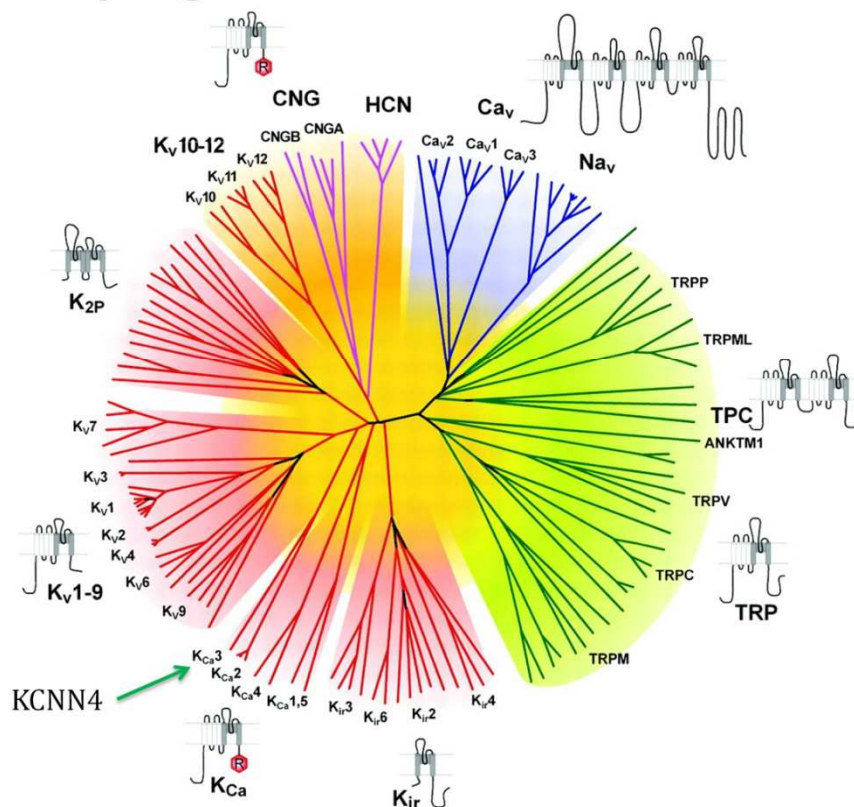
**Abbildung 4:** Die dem FGF-Rezeptor nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden. Vereinfachte Darstellung (modifiziert nach (Eswarakumar, Lax and Schlessinger, 2005)).

Unter diesen zahlreichen Zielen der MAP-Kinase befinden sich auch Gene, die für Ionenkanalproteine codieren. Einer dieser Ionenkanäle ist der calziumabhängige Kaliumkanal KCNN4, dessen Expression durch die Aktivität der Ras/Raf/MEK/ERK Kaskade reguliert wird (Peña *et al.*, 2000). Er spielt mit seinem Einfluss auf das Membranpotential und die transmembranären Ionenströme eine wichtige Rolle für die Proliferation von Zellen, insbesondere von Fibroblasten bei der Nierenfibrose (Grgic *et al.*, 2009). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchungsmodulation dieses Kaliumkanals durch FGF-2.

### 1.3 Kaliumkanäle

Die Zellmembran jeder Säugetierzelle enthält zur Herstellung ionenspezifischer Leitfähigkeiten zahlreiche porenförmige Proteine. Unter diesen Ionenkanalproteinen stellen die Kaliumkanäle die größte und heterogenste Gruppe aller Ionenkanäle - über 70 bekannte Gene codieren für Kaliumkanäle.

# Phylogenetik der Ionenkanäle



**Abbildung 5:** Phylogenetischer Stammbaum der Ionenkanäle der VIC-Superfamilie (hergeleitet durch die Aminosäurezusammensetzung ihrer Porenregion), Rot gezeigt sind alle Kaliumkanäle. In der Gruppe der calciummodulierten, spannungsabhängigen Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ) gehört der KCNN4 in der Gruppe  $K_{Ca3}$ . (modifiziert nach (Yu *et al.*, 2005))

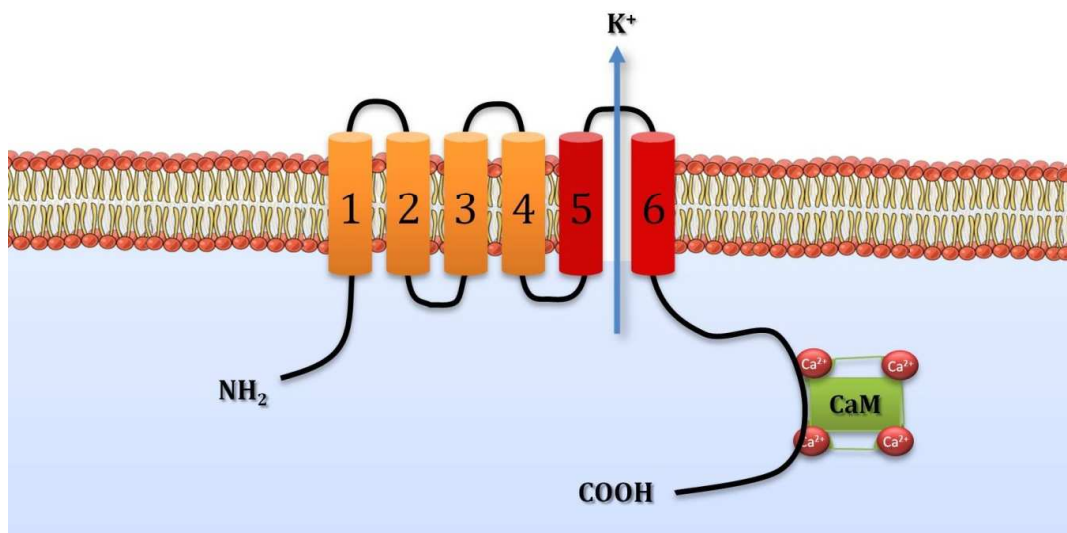
Neben den einwärtsgleichrichtenden  $K_{ir}$ -Kanälen (*inward-rectifiers*) und den spannungsabhängigen  $K_v$ -Kanälen existieren doppelporige ( $K_{2P}$ ) und calciummodulierte Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ). Diese Gruppe der  $K_{Ca}$ -Kanäle besteht aus Kanälen mit struktureller Ähnlichkeit, die sich funktionell nach ihrer Leitfähigkeit einteilen lassen: Neben einem Kanal mit hoher Leitfähigkeit (*big-conductance  $K^+$ -Channel*, BK, IUPHAR:  $K_{Ca}1.1$ , HGNC: KCNMA1) und 3 Kanälen niedriger

Leitfähigkeit (*small-conductance K<sup>+</sup>-Channels*, SK, IUPHAR: K<sub>Ca</sub>2.1-2.3 HGNC: KCNN1-3) existiert ein Kanal intermediärer Leitfähigkeit, der elektrophysiologisch als *intermediate-conductance K<sup>+</sup>-Channel* (kurz: *IK<sub>Ca</sub>1* IUPHAR: K<sub>Ca</sub>3.1; „Gardos Channel“) bezeichnet wird. In der folgenden Arbeit wird die genetische Nomenklatur des *HUGO Gene Nomenclature Committee* (HGNC) verwendet, wonach dieser Kanal als KCNN4 bezeichnet wird.

### 1.3.1 Der *intermediate-conductance K<sup>+</sup>-Channel* KCCN4 (IK<sub>Ca</sub>1; IUPHAR: K<sub>Ca</sub>3.1)

Der calciumabhängige Kaliumkanal KCNN4 wurde 1958 von Gardos durch eine Arbeit über den Einfluss des Calciums auf die Kaliumleitfähigkeit der Erythrozytenmembran erstbeschrieben (Gardos, 1958). KCNN4-Kanäle zeigen unter symmetrischen Kaliumkonzentrationen von 160mM eine Leitfähigkeit von 30-80pS, in Ringerlösung liegt sie bei 11pS.

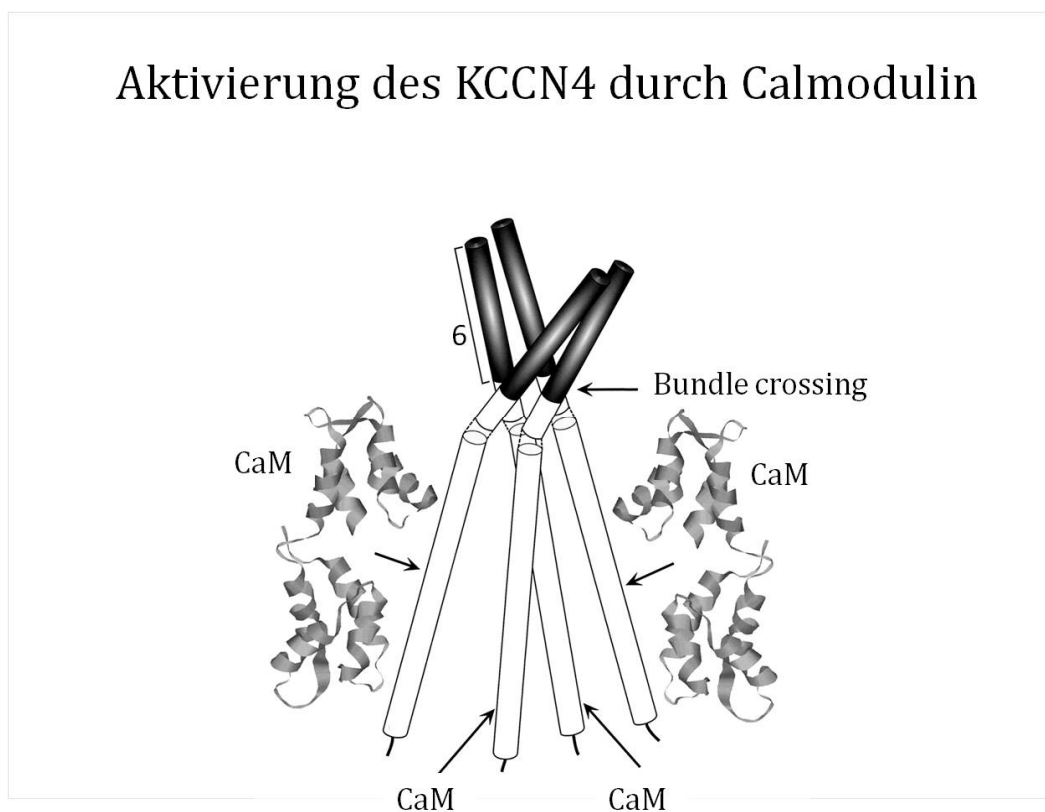
## Struktur einer Untereinheit des KCNN4



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Struktur einer Untereinheit des KCNN4. Gezeigt sind die 6 transmembranären Domänen (S1-S6), von denen Domäne 5 und 6 (in Rot) zur Bildung der Pore beitragen. Intrazellulär COOH-seitig liegt die Bindungsstelle für Calmodulin (CaM). (modifiziert nach (Wulff *et al.*, 2001; Grgic, 2005))

Sie werden zwar unter physiologischen Bedingungen als Kaliumselektiv angesehen, leiten aber auch Rubidiumionen (Rb<sup>+</sup>) und - mit deutlich geringer

Permeabilität -  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{Cs}^+$  (Grissmer, Nguyen and Cahalan, 1993). Sie sind leicht einwärtsrektifizierende Homotetramere, bestehen also aus vier identischen Untereinheiten. Jede Untereinheit enthält dabei sechs zellmembrandurchspannende Domänen. KCNN4 ist nicht spannungssensitiv – seine Aktivierung erfolgt durch Calcium. Allerdings weist der Kanal selbst - im Gegensatz zu anderen  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanälen - keine Calciumbindungsstelle auf. Die Funktion des Calciumsensors übernimmt das kleine Protein Calmodulin. Im Komplex mit vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bindet es intrazellulär an ein COOH-seitig gelegenes Bindungsmotiv.



**Abbildung 7:** Aktivierung des KCCN4 durch Calmodulin: Gezeigt ist die Anordnung der porenbildenden Domänen S5 und S6 (schwarz) der 4 Kanaluntereinheiten. Sie kreuzen sich auf der zytoplasmatischen Seite („Bundle crossing“) und streben extrazellulär sternförmig auseinander. Die Bindung eines Calmodulin- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexes je Untereinheit erfolgt an eine in der Nähe des Bundle-crossings gelegene Region. (Gezeigt sind schematisch 2 CaM-Moleküle ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ). Diese Bindung induziert eine Konformationsänderung der S6 Region, die zum Öffnen der Pore in jeder Untereinheit erfolgen muss. Ein Kanalmolekül muss zur Öffnung also vier Calmodulinmoleküle mit je 4  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden. (modifiziert nach **Fanger et al., 1999**)

Durch die Calmodulinbindung wird eine Konformationsänderung der S6-Domäne im Bereich des sog. *bundle-crossings* induziert. Findet diese bei allen vier Untereinheiten durch Bindung des Calmodulin-Ca<sup>2+</sup>-Komplexes statt, öffnet die Pore (Fanger *et al.*, 1999; Khanna *et al.*, 1999). Der hierfür notwendige Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> erfolgt in der Regel durch IP3-induzierte intrazelluläre Calciumfreisetzung nach Aktivierung durch physiologische Aktivatoren wie Acetylcholin, ATP oder Bradykinin (Sauvé *et al.*, 1990). Außerdem lässt sich der Kanal pharmakologisch durch spezifische Agonisten öffnen: Hierzu gehören, neben den Benzoimisazolinonen *1-EBIO* und seinem dichlorierten Abkömmling *DCEbio* (5,6-Dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one, (Singh *et al.*, 2001)) auch der potenteste Öffner des Kanals, *NS309* (6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione 3-oxime, (Strøbæk *et al.*, 2004)). Daneben sind zahlreiche spezifische Blocker des Kanals beschrieben: Mit einer IC<sub>50</sub> von 2,0 nM blockiert das Polypeptid *Charybdotoxin*, das Neurotoxin des Skorpions *Leirus quinquestriatus*, den Kanal hochpotent (Khanna *et al.*, 1999). Auch *Maurotoxin*, das Gift des Skorpions *Maurus palmatus*, und das Antimykotikum Clotrimazol sind effektive Blocker. Hieraus ließen sich synthetische, spezifische Blocker, die Triarylmethane, ableiten. Von denen ist TRAM-34 (1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole) der potenteste (IC<sub>50</sub>: 20 nM) und gegenüber anderen K<sub>Ca</sub>-Kanälen selektivste (Wulff *et al.*, 2000), weshalb es routinemäßig zur Identifikation von KCNN4-Strömen herangezogen wird. Es kann die Pore durch seine schraubenförmige Struktur an der S5-Poren-S6-Region des KCNN4 von intrazellulär blockieren (Wulff *et al.*, 2001).

### 1.3.2 Die Funktion des KCNN4

Wenngleich die Expression des Kanals in vielen Geweben und Zellen wie Endothelien, glatten Muskelzellen, T-Zellen, dendritische Zellen, Epithelien der Gallenwege- und des Pankreas und Fibroblasten (Logsdon *et al.*, 1997; Nilius and Droogmans, 2001; Shepherd *et al.*, 2007; Dutta *et al.*, 2009; Grgic *et al.*, 2009; Di *et al.*, 2010; Shao, Makinde and Agrawal, 2011; Hayashi *et al.*, 2012) nachgewiesen wurde, ist über seine physiologische Funktion bisher deutlich weniger bekannt: Neben der Volumenregulation von Erythrozyten (Gardos, 1958; Brugnara, 1997) spielt – insbesondere für die vorliegende Arbeit – der proliferationsunterstützende Effekt des Kanals eine wichtige Rolle. Dieser wurde am intensivsten in

Lymphozyten, Endothelien und Fibroblasten untersucht: In ruhenden Lymphozyten liegt die intrazelluläre Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  mit 50-100nM deutlich unter der Aktivierungsschwelle von KCNN4-Kanälen von 200-300nM. Die Kanäle sind unter diesen Umständen geschlossen und tragen nicht zur Kaliumleitfähigkeit der Membran bei (Lewis and Cahalan, 1995). Nach mitogener Stimulation steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern (dem endoplasmatischen Retikulum, ER) und dem Einstrom von extrazellulär deutlich an. Dieser Calciumeinstrom ist gleichzeitig Motor und *second-messenger* für zahlreiche Prozesse der zellulären Proliferationsmaschinerie (u.a. calcineurininduzierte Transkriptionsregulation). Durch den Einstrom dieser doppelt-positiv geladenen Calciumionen depolarisiert das Membranpotential und würde als gegensätzlich wirkende Kraft den Calciumeinstrom begrenzen. Dies wird durch KCNN4-Kanäle verhindert: Sie stellen nach Öffnung durch die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration eine Kaliumpermeabilität der Membran her, die zum Ausstrom positiv geladener  $K^+$ -Ionen führt. Die hierdurch aufrechterhaltene negative Hyperpolarisation der Zellmembran unterstützt den anhaltenden Calciumeinstrom (Nilius and Droogmans, 2001; Ledoux *et al.*, 2006). Dies geschieht nicht nur durch die bereits in die Zellmembran integrierten Kanalproteine: Die Expression der Kanalproteine wird nach Stimulation erhöht. Exprimieren T-Zellen in Ruhe lediglich ca. 20 Kanäle, so steigt die Anzahl von  $K_{(Ca)}$  Kanälen in der Membran nach Aktivierung auf >500 an (Grissmer, Nguyen and Cahalan, 1993). Ebenso steigt die Expression des KCNN4 nach Stimulation in glatten Gefäßmuskelzellen (Si *et al.*, 2006), Endothelzellen (Grgic *et al.*, 2005) und in Fibroblasten (Peña and Rane, 1999; Wang *et al.*, 2013). Diese Expressionsveränderungen sind nicht nur ein Paraphänomen, vielmehr scheinen proliferierende Zellen auf die Kaliumleitfähigkeit durch diese Kanäle angewiesen zu sein: So hemmt die selektive Blockade des Kanals die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und die Angiogenese (Grgic *et al.*, 2005). Auch scheint die Inhibition des Kanals Immunsuppressiv zu wirken (Wulff *et al.*, 2000): In Mausmodellen lässt sich durch seine pharmakologische Blockade eine T-Zell-vermittelte, inflammatorische Colitis hemmen (Di *et al.*, 2010). Entscheidend für die vorliegende Arbeit ist jedoch seine Relevanz bei fibrosierenden Nierenerkrankungen: In verschiedenen Fibrosemodellen konnte die Heraufregulation der Kanalexpression mit

zunehmender Fibroseaktivität gezeigt werden: Diese Expressionssteigerung ließ sich in-vivo an Mäusen mit einer durch unilaterale Ureterobstruktion (UUO) induzierte Nierenfibrose nachweisen. Die gleichzeitige Gabe des selektiven KCNN4-Inhibitors TRAM-34 hemmte die Fibroseentwicklung. Die Proliferationshemmung nach pharmakologischer Kanalblockade zeigen sich ebenso in in-vitro Fibrosemolellen, beispielsweise nach mitogener Stimulation kultivierter Fibroblasten (Grgic *et al.*, 2009). Über die Mechanismen, die die Regulation der Expression des Kanals beeinflussen, ist bis heute wenig bekannt. Als einzige Signalkaskade konnte bisher ein Einfluss der Ras/RAF/MEK/ERK Kaskade auf die Expression des Kanals gezeigt werden (Peña *et al.*, 2000). Gegenstand dieser Arbeit ist daher die Frage, ob die Kanalexpression durch weitere, bisher unbekannte Mechanismen wie beispielsweise kurze, nichtkodierende RNA-Moleküle, die sog. Micro-RNAs, reguliert wird.

## **1.4 MicroRNA**

### **1.4.1 Entdeckung der MicroRNAs**

MicroRNAs (abgekürzt: miRNAs) sind kleine, nicht kodierende RNA-Oligonucleotide von 21-25 Basenpaaren Länge. Ihre Entdeckung geht auf die Beobachtungen der Larvenentwicklung des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* zurück: Die zeitliche Entwicklung seiner Larvenstadien wird von dem Gen *lin-4* gesteuert. 1993 entdeckten Rosalind Lee und Rhonda Feinbaum, dass *lin-4* nicht für ein Protein codiert, sondern ein kurzes RNA-Molekül entsteht (Lee, Feinbaum and Ambros, 1993), das durch komplementäre Basenpaarung mit der 3'UTR des Gens von *lin-14* interagiert und so dessen Expression supprimiert. Als klar wurde, dass *lin-4* nur ein Vertreter einer ganzen Klasse endogener, nicht-proteinkodierender RNA-Moleküle ist, eröffnete dies das neue Forschungsfeld der RNA-Interferenz als Genregulationsmechanismus, für das Andrew Fire und Craig Mello 2006 den Nobelpreis erhielten (Fire *et al.*, 1998). Nach den ersten Arbeiten von Lee und Feinbaum dauerte es weitere 7 Jahre, bis mit *let-7* erstmals der Nachweis konservierter miRNAs in zahlreichen weiteren Organismen, unter

anderem auch im Menschen, gelang (Reinhart *et al.*, 2000; Lagos-Quintana *et al.*, 2001). Im Februar 2017 enthielt die Datenbank *mirBase* die Sequenzen von 1881 im Menschen identifizierten miRNAs (Kozomara and Griffiths-Jones, 2011).

#### 1.4.2 Funktion und Biogenese von MicroRNAs

MiRNAs werden in einem gewebspezifischen Muster exprimiert und beeinflussen zahlreiche zelluläre Funktionen wie Entwicklung, Stoffwechsel, Differenzierung, Zelltod und Proliferation (Lewis *et al.*, 2003; Bartel, 2004). Sie bilden mit ähnlichen miRNAs phylogenetische Familien, die sich nur durch wenige Basen in ihrer Nukleotidsequenz unterscheiden. Die Gene für die Mitglieder einer miRNA-Familie liegen im Genom oft nah beieinander in sog. *clustern*. Nur eine Minderheit (ca. 25%) der humanen miRNA-Gene liegen in Introns proteinkodierender Gene und werden gemeinsam mit einer pre-messenger-RNA abgelesen (Lau *et al.*, 2001; Aravin *et al.*, 2003). Die Expression von miRNAs ist hochvariabel: Es existieren teilweise große gewebs- oder zellspezifische Unterschiede und auch eine zeitliche Variabilität der Expression innerhalb des gleichen Zelltyps, beispielsweise werden miRNAs während verschiedener Phasen der Entwicklung oder Differenzierung unterschiedlich stark exprimiert. Die Regulation der Expression einzelner miRNAs ist – abgesehen von den miRNAs, die in Introns einer pre-mRNA liegen und deren Regulationselemente gebrauchen – größtenteils ungeklärt. Die Mechanismen ihrer Produktion sind hingegen in den letzten Jahren detailliert beschrieben worden: Der erste Schritt ist die Transkription eines miRNA-Genabschnittes durch die RNA-Polymerase II (pol II). Das entstandene Vorläufermolekül, die sog. pri-miRNA, besteht in der Regel aus mehreren Kilobasen und ist 5'-seitig gecapt und 3'-polyadenyliert (Cai, Hagedorn and Cullen, 2004). Es bildet durch endogene Basenpaarung komplementärer Abschnitte eine Haarnadelstruktur (*hairpin*) aus, an deren Kopf einige nicht komplementäre Basen eine Ringstruktur (*stem-loop*) ausbilden. Diesen Ring am Ende des Doppelstranges der pri-miRNA erkennt ein nukleärer Proteinkomplex aus der RNase *Drosha* und dem Cofaktor *DGCR8* (DiGeorge syndrome critical region gene 8) und kürzt das Transkript vor und nach der Ringstruktur auf insgesamt 60-70 Basenpaare (Lee *et al.*, 2003). Der so entstehende Micro-RNA-Vorläufer (miRNA-Precursor; kurz: pre-miRNA) enthält 3'-seitig einen kurzen Überhang, der für den folgenden Transport aus dem Zellkern durch Exportin 5 essentiell ist (Bohnsack, Czaplinski and Görlich, 2004). Im



Zytoplasma kürzt die RNase III *Dicer* die pre-miRNA auf einen Doppelstrang mit je ~ 22 Basenpaaren (Hutvágner *et al.*, 2001). Von diesen beiden Strängen wird in der Regel der Strang, mit der schwächeren 5'-Basenpaarung selektioniert, der andere Strang wird abgebaut (Schwarz *et al.*, 2003). Der positiv-selektionierte Strang entspricht der reifen miRNA. Diese entfaltet ihre Wirkung gemeinsam mit einem als RISC (*RNA-induced silencing complex*) bezeichneten Ribonucleoproteinkomplex. Das humane Homolog des Argonautenproteins, das Protein *eIF2C2*, präsentiert darin die miRNA und leitet so den RISC zu Ziel-mRNAs, die in ihrer 3'UTR eine komplementäre Bindungsstelle zur Basenpaarung einer Sequenz der miRNA aufweisen (Mourelatos *et al.*, 2002). Diese mRNAs können durch den RISC auf verschiedene Weise an der Expression ihres codierten Proteins gehindert werden: Entweder durch direktes Zerschneiden der mRNA (der RISC enthält eine Endonuclease), durch translationale Repression oder durch Destabilisierung der mRNA durch Deadenylierung ihres PolyA-Schwanzes. Die Mechanismen, die dazu führen ob eine Ziel-mRNA entweder geschnitten, destabilisiert oder an ihrer Translation gehindert wird, scheinen sich in den unterschiedlichen Modellorganismen erheblich zu unterscheiden und sind Gegenstand aktueller Forschung. Das Ausmaß der Komplementarität zwischen miRNA und Ziel-mRNA scheint hierfür eine wichtige Rolle zu spielen (Bartel, 2004). So können miRNAs die Expression zahlreicher proteinkodierender mRNAs beeinflussen: Untersucht man die Konservierung von miRNA-Bindungsstellen im Genom, findet man in 30% aller Gene einen Selektionsdruck hin zur Konservierung einer miRNA-Bindungsstelle. Dies lässt vermuten, dass die Expression von mindestens 5.800 menschlicher Gene durch miRNAs reguliert wird (Lewis, Burge and Bartel, 2005). Zum Einfluss von miRNAs auf Ionenkanäle und insbesondere die Expression des Calcium-abhängigen Kaliumkanals KCNN4 liegen zum Zeitpunkt der Arbeit noch keine Erkenntnisse vor. Daher geht die folgende Arbeit der Fragestellung nach, ob KCNN4 durch eine miRNA reguliert wird und insbesondere, ob miRNAs eine Rolle bei der Heraufregulation des KCNN4 bei Nierenfibrose spielen.

## 2. Materialien und Methoden

Folgende Geräte und Chemikalien der genannten Hersteller wurden für diese wissenschaftliche Arbeit eingesetzt:

### 2.1 Chemikalien

#### 2.1.1 Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose 4,5g/L incl. Sodiumpyruvat + L-Glutamin	PAA Cell Culture Company, USA
Fetales Kälberserum: FBS Gold A15-151	PAA Cell Culture Company, USA
Penicillin/Streptomycin [100x] P11-010	PAA Cell Culture Company, USA
Trypsin EDTA [10x] L11-003	PAA Cell Culture Company, USA
Spüllösung Dulbeccos PBS without MG and Ca <sup>2</sup>	PAA Cell Culture Company, USA

#### 2.1.2 Profibrotische Stimulation

FGF-2: Humaner Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), rekombinant (E.coli) LOT: 61946	BD Biosciences, USA
TGFβ-1: rHU TGF-Beta-1, rekombinant (A293 Zellen) C-63501	Promo Kine, Deutschland,

#### 2.1.3 Proliverationsversuche

MTT Cell Proliferation KIT 1 11465007001	Roche, Deutschland
------------------------------------------	--------------------

#### 2.1.4 Elektrophysiologische Untersuchungen (Patch Clamp)

TRAM-34	UC Davis, USA
---------	---------------

## 2.1.5 Genexpression

DNase 1, rekombinant, RNase frei 040716728001	Roche, Schweiz
PeqGOLD 50bp DNA-Leiter LOT: 63834	Peqlab Biotechnologie, Deutschland
DNA Loading Dye R0611	Fermentas (heute: Thermo Scientific), USA
dNTP Mix 10mM R0193	Fermentas (heute: Thermo Scientific), USA
Revert Aid Reverse Transcriptase #EP0441	
(inkl. 5x Reaction Buffer: 250 mM Tris-HCl, pH 8.3 bei 25°C, 250 mM KCl, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT)	Fermentas (heute: Thermo Scientific), USA
Absolute Blue QPCR SYBR Green low ROX Mix	Fermentas (heute: Thermo Scientific), USA
Wasser, PCR Grad	Fermentas (heute: Thermo Scientific), USA

**Tabelle 4:** Primer

Primerbezeichnung	Sequenz
<b>GAP for.</b>	5'-CAATGAATACGGCTACAGCAA
<b>GAP rev.</b>	5'-AGGGAGATGCTCAGTGTGG
<b>KCNN4 for.</b>	5'-CATCACATTCCTGACCATCG
<b>KCNN4 rev.</b>	5'-ACGTGCTTCTCTGCCTTGTT

## 2.1.6 MicroRNA Untersuchungen

TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA 4366596)  
TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems, USA)

**Tabelle 5:** MicroRNA-spezifische qPCR Assays

Assay Name	Assay ID	LOT Nummer	Reporter	Zielsequenz
<b>mmu-miR-129-2-3p</b>	001184	P110828-005D03	FAM	AAGCCCUUACCCCAAAAAGCAU
<b>mmu-miR-503</b>	002456	P110831-001G06	FAM	UAGCAGCGGGAACAGUACUGCAG
<b>664268 (snoRNA202)</b>	001232	P110906-002A08	FAM	GCTGTACTGACTTGATGAAAGTACTTTTGAACCTTTTCCATCTGATG

## 2.1.7 MicroRNA Microarray

CyScribe cDNA Post Labelling Kit RPN5660	Amersham Pharmacia, heute: GE, USA
PCR-Purifications-Kit 28104	Quiagen, USA
HybriSlip	Grace Bio-Labs, USA

PCR-Purifications-Kit 28104  
Mouse miRNA Microarray Chip Release 15.0 8x15K  
Trizol RNA Isolation Kit

Quiagen, USA  
Agilent Technologies, USA  
Thermo Scientific, USA

## 2.2 Geräte

Axio Observer Z1 Mikroskop  
EIA Reader Multiscan EX  
Elektrophorese Spannungsgeber: EV243  
Elektrophoresekammer: Agagel Mini Biometra  
Eppis Safe Seal 1,5ml  
Gewebekulturplatte TC Plate  
inverses Zellkulturmikroskop  
Kühlzentrifuge Heraeus Megafuge 11R  
Micro Array Scanner: Scanner G2505C (US83203533)  
Mikropipettenausziehgerät DMZ-Universal-Puller  
Wasserreinigungsanlage  
NanoDrop 2000  
Patch Clamp Verstärker EPC-9  
PCR Cyclyer: Thermo 3000 Thermocycler  
Pipetten Finnpiquette  
Pipettenspitzen Biosphere Fil. Tips  
Real-Time PCR Cyclyer: 7550 Real Time PCR System  
Serologische Pipetten  
Sterilarbeitsbank Hera Safe  
Zellkulturflasche TC Flasche T75  
Zellkulturinkubator Heracell 150i CO2 Incubator  
Zellschaber (steril, einzeln)  
Zentrifuge Heraeus Pico 17

Zeiss, Deutschland  
Thermo Scientific, USA  
Peqlab, Deutschland  
Biometra, Deutschland  
Sarstedt, Deutschland  
Greiner bio-one, Österreich  
Nikon, Japan  
Thermo Scientific, USA  
Agilent Technologies, USA  
Zeitz Instrumente, Deutschland  
Merck Millipore, Deutschland  
Thermo Scientific, USA  
HEKA, Lambrecht, Deutschland  
Biometra, Deutschland  
Thermo Scientific, USA  
Sarstedt, Deutschland  
Applied Biosystems, USA  
Sarstedt, Deutschland  
Thermo Scientific, USA  
Sarstedt, Deutschland  
Thermo Scientific, USA  
Sarstedt, Deutschland  
Thermo Scientific, USA

## 2.3 Methoden

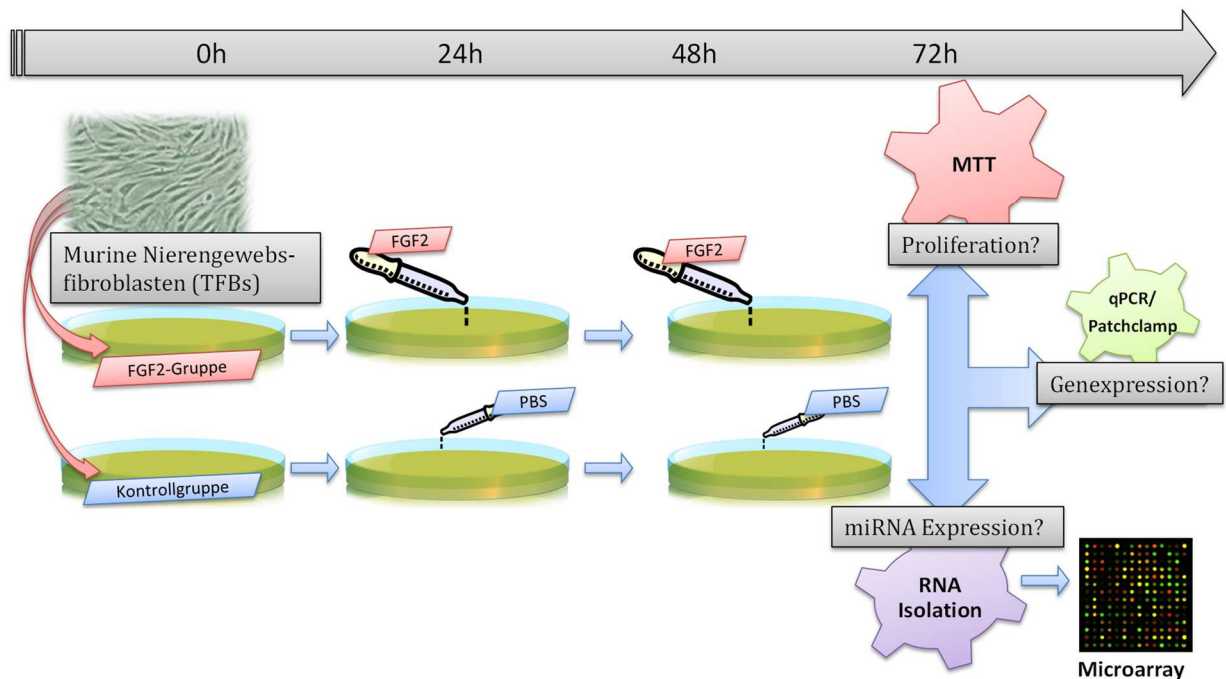
### 2.3.1 Zellkultur

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Nierengewebsfibroblasten (TFBs) erfolgte in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose 4,5g/L incl. Sodiumpyruvat + L-Glutamin) mit 10% FBS (Fetales Kälberserum, FBS

Gold A15-151) und 2% Antibiotika (Penicillin/Streptomycin P11-010). Die Zellen wurden in liegenden Zellkulturflaschen mit Filter in einer 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde alle 72h gewechselt. Bei 80%iger Konfluenz wurden die Zellen trypsinisiert, in PBS gewaschen und entweder in einer Neubauerkammer gezählt und in Petrischalen zur Stimulation ausgesät (Versuchsaufbau siehe unten) oder erneut nach 1:10 Verdünnung zum Erhalt der Kultur in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Stimulation erfolgte mit Zellen in der 3-10 Passage nach Auftauen.

### **2.3.2 Stimulation mit profibrotischen Zytokinen - in-vitro Fibrosemodell**

Das dieser Arbeit zu Grunde liegende in-vitro Fibrosemodell beruht auf der Stimulation von Fibroblasten mit dem profibrotischen Zytokin FGF-2. Als Voraussetzung für die Untersuchung der Regulation des KCNN4 durch miRNAs wurde dabei eine Heraufregulation der Kanalexpression bei gleichzeitigem Nachweis der vermehrten Proliferation angesehen. Dazu wurden das von der Arbeitsgruppe bereits beschriebene, FGF-2-basierte in-vitro-Fibrosemodell angepasst (Grgic *et al.*, 2009). Das angewandte Stimulationsprotokoll ermöglicht es die Zellen unabhängig vom Ziel des Experiments (mRNA-Expression, funktionelle Kanaluntersuchungen, Proliferation, miRNA-Expression) bis zur Prozessierung nach 72 Stunden nahezu identischen Stimulationsbedingungen zu unterziehen und so eine größtmögliche Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen.



**Abbildung 8:** Ablauf der mitogenen Stimulation: Die auf Mangelmedium kultivierten Fibroblasten werden auf Petrischalen ausgesät. Nach 24h erfolgte die Stimulation durch Zugabe von FGF-2 (10 ng/μl) bzw. Vehikel (PBS). Die Stimulation wird nach weiteren 24h wiederholt (t=48h). Nach weiterer eintägiger Inkubation (t=72h) erfolgt - je nach Fragestellung - die Prozessierung in das MTT-Proliferationsassay, die Genexpressionsuntersuchungen (qPCR, Patch-Clamp) oder die RNA-Isolation zum MicroRNA-MicroArray.

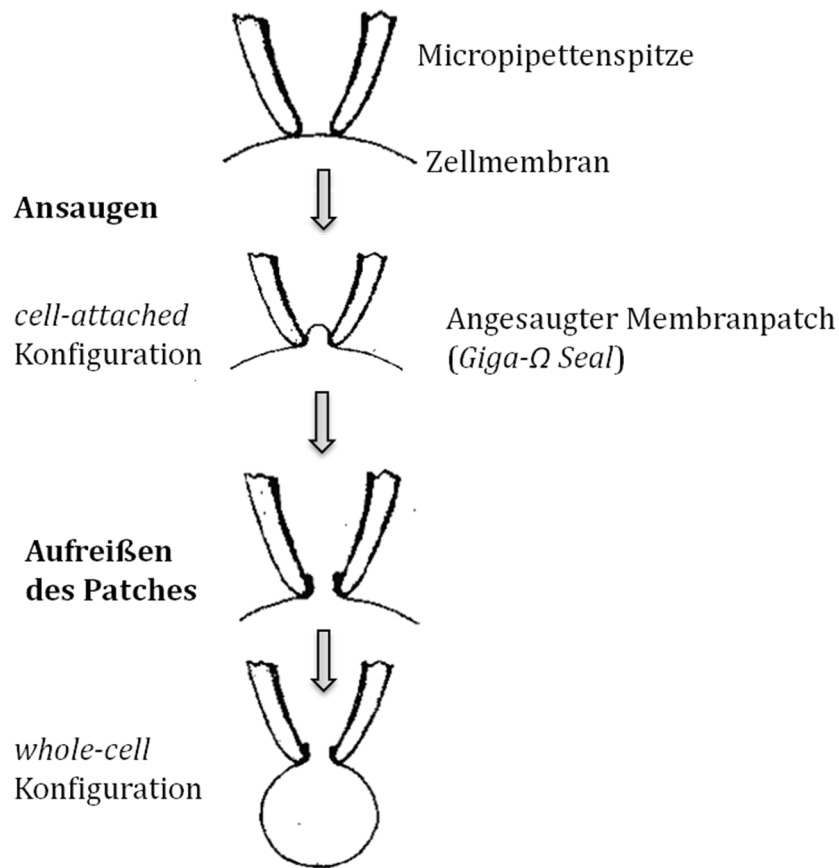
Die im Mangelmedium kultivierten, murinen Nierengewebsfibroblasten (TFBs) wurden bei ca. 80%iger Konfluenz durch Trypsin (0,5%, 60 Sek.) aus den Zellkulturflaschen gelöst, in PBS<sup>+/+</sup> gewaschen und in einer Neubauerkammer gezählt. Für die Untersuchungen mit anschließender RNA-Isolation wurden 100.000 Zellen mit 10ml Mangelmedium in Petrischalen überführt (t=0h). Nach einer Anwuchszeit von 24h wurden die Zellen durch Zugabe von 100ng FGF-2 (gelöst in 100μl PBS) stimuliert, während die Kontrollgruppe ausschließlich 100μl PBS erhielt (t=24h). Die Konzentration von FGF-2 im Medium der Verum-Gruppe lag damit bei 100ng/10ml  $\hat{=}$  10ng/ml. Diese Stimulation wurde nach weiteren 24h (t=48h) auf gleiche Weise wiederholt. Nach erneuter Inkubation für 24h (t=72h) erfolgte die RNA-Isolation für qPCR- und MicroRNA-Untersuchungen. Die

Stimulation der Zellen zur Proliferationsmessung lief nach identischem Schema ab. Die Proliferationsmessungen wurden in 96-Well-Platten durchgeführt. Für die Patch-Clamp Untersuchungen wurden kleinere Petrischalen (2ml) eingesetzt und die Menge von Wachstumsfaktor und Medium entsprechend angepasst. Zusätzlich wurde bei den Patch-Clamp Messungen kurz vor der Messung ein Zwischenschritt mit Trypsinierung und erneutem Anwachsen auf Glasplättchen eingefügt (siehe dort).

### **2.3.3 Elektrophysiologische Untersuchungen – *Patch Clamp***

*Patch Clamp* ist eine Methode zur Messung transmembranöser Ionenströme. Die Technik ermöglicht durch eine spezielle Messapparatur die Ableitung von Strömen einzelner Ionenkanäle sowie der gesamten Zellmembran und brachte den Urhebern Erwin Neher und Bert Sakman 1991 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie ein (Neher and Sakmann, 1976; Hamill *et al.*, 1981). Für eine Patch-Clamp-Messung wird die Membran einer Zelle an eine spezielle Mikropipette angesaugt. Dabei treten starke Adhäsionskräfte an der Grenze dieses kleinen, von der Pipette umschlossenen Zellmembranbereichs (dem sog. *Patch*; Fläche <  $1\mu\text{m}^2$ ) auf, die zu einer sehr hohen elektrischen Abdichtung gegenüber dem außen liegenden Rest der Zellmembran führen. Dieser hohe Widerstand (3-10 G $\Omega$ , sog. *Giga- $\Omega$ -Seal*) ist Voraussetzung für die folgende Messung der Ionenströme. Dazu wird das Membranpotential mit Hilfe eines Verstärkers auf eine definierte Spannung geklemmt (Spannungsklemme) und der dabei fließende Strom gemessen. Ändert sich die Membranleitfähigkeit durch das Öffnen oder Schließen von Ionenkanälen, führt dies nach dem Ohmschen Gesetz zu einer Veränderung des registrierten Stroms. Zur Messung stehen unterschiedliche Konfigurationen zur Verfügung: Nach dem Ansaugen der Membran können zunächst die Ströme durch Kanäle im Bereich des *Patches* gemessen werden. In dieser *cell-attached*-Konfiguration ist die Auflösung bis hin zu Einzelkanalströmen möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren als funktionelle Untersuchung zur Quantifizierung der Expression des KCNN4 (frühere, elektrophysiologische Bezeichnung: IkCa1) eingesetzt. Dazu kam ausschließlich die Ganzzellableitung (eng. *whole-cell* Konfiguration) zum Einsatz, weshalb hier nur auf diese Form näher eingegangen wird:

# Patch-Clamp Konfiguration



**Abbildung 9:** Grundlegende Messkonfigurationen bei Patch-Clamp-Untersuchungen: Nach Aufbringen der Mikropipette auf die Zelle wird ein kleines Stück Zellmembran, der sog. *Patch*, angesaugt. Dichtet die Pipette den umschlossenen Patch elektrisch sehr gut ab, entsteht ein hoher Widerstand: Das sog. Giga-Ω-Seal. In dieser Konfiguration (*cell-attached*) können die Ionenströme über dem Patch bis hin zu Einzelkanalströmen aufgelöst werden. Wird die Zellmembran im Bereich des Patches aufgerissen, entsteht eine elektrische Verbindung vom Inneren der Pipette zum Inneren der Zelle. Dies entspricht der *whole-cell* Konfiguration, mit der die Summenströme aller Kanäle der Zellmembran abgeleitet werden. (modifiziert nach Hamill et al. 1981)

Um die Ionenströme über der gesamten Zellmembran messen zu können, wird nach dem Erreichen eines Giga-Ω-Seals in der *cell-attached*-Konfiguration die Zellmembran durch Strom oder Unterdruck aufgerissen. Dadurch wird eine elektrische Verbindung vom Inneren der Pipette zum Zellinnenraum hergestellt. Nach dem Klemmen der transmembranösen Spannung zwischen dem Inneren der Pipette und dem Wasserbad entspricht der gemessene Strom nun der Summe aller Einzelkanalströme der Zellmembran. Außerdem lässt sich in dieser Konfiguration



das zytoplasmatische Milieu durch Zugabe vorbereiteter Elektrolytlösungen in die Pipette kontrollieren. Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurden calciumreiche Lösungen eingesetzt, um die Öffnungswahrscheinlichkeit der calcium-abhängigen Kaliumkanäle zu maximieren. Die Vergleichbarkeit unterschiedlich großer Zellen wird durch Normierung des Stroms (I) auf die ebenfalls gemessene Kapazität (C) der Zellmembran sichergestellt:

$$\frac{I}{C} = \frac{\text{Strom bei } 0\text{mV (pA)}}{\text{Kapazität (pF)}}$$

Die TFBs wurden zunächst in kleinen 35mm-Kulturschalen kultiviert und nach dem oben beschriebenen Stimulationsprotokoll zweimalig mit FGF-2 stimuliert. Als einzige Modifikation gegenüber dem oben beschriebenen Vorgehen wurden die Zellen für die Patch-Clamp Messungen 12 Stunden vor der Untersuchung erneut trypsiniert, in PBS gewaschen und mit dem gleichen Medium in eine neue Schale mit kleingebrochenen Deckplättchen gegeben. Diese Plättchen konnten anschließend für jede Messung einzeln entnommen werden. Die Aufzeichnungen der Ströme erfolgten mit einem EPC-9 *patch-clamp amplifier* (HEKA) unter Nutzung von Spannungsrampen (1000ms, -100 bis + 100mv). Die Pipettenlösung enthielt zur maximalen Aktivierung der calciumabhängigen Kaliumkanäle 3µmol/L freies Ca<sup>2+</sup>.

**Tabelle 6:** Zusammensetzung der *Patch Clamp* Lösungen [M. Kacik]

	Pipettenlösung (in mmol/L)	Badlösung (in mmol/L)
NaCl	0	137
KCl	140	3
Na <sub>2</sub> ATP	1	0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0	4,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0	1,5
MgCl <sub>2</sub>	1	0,4
EGTA	2	0
CaCl <sub>2</sub>	1,91	0,7
HEPES	5	0
Glukose	0	10
pH	7,2	7,4

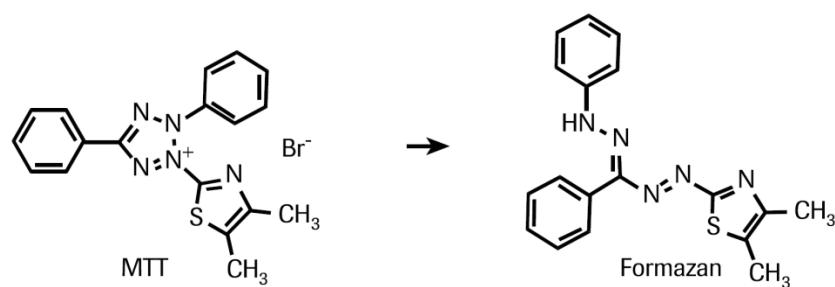
Es wurden stets Zellen der nicht-stimulierten Kontrollgruppe mitgeführt, wobei der Untersucher über die Gruppenzugehörigkeit verblindet war. Zum Vergleich der beiden Gruppen wurde der Mittelwert der auf die Kapazität normierten Ströme der Einzelmessungen bei 0mV herangezogen. Ein Strom galt dann als KCNN4-spezifisch, wenn er durch Zugabe des spezifischen Blockers TRAM-34 supprimierbar war. Die Signifikanztestung erfolgte mittels t-Test. Die Untersuchungen wurden gemeinsam mit Michael Kacik in den Laboren der Arbeitsgruppe Prof. J. Hoyer im Biomedizinischen Forschungszentrum der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

### **2.3.4 Proliferationsexperimente**

Zur objektiven Quantifizierung von Zellproliferation existieren zahlreiche Verfahren, die sich auf Grund ihres Messprinzips in zwei große Gruppen einteilen lassen: Die eine Gruppe der Verfahren basiert auf der Messung von DNA-Synthese durch den Einbau spezieller Metaboliten in die DNA während der S-Phase des Zellzyklus. Dazu gehören zum Beispiel der traditionelle Goldstandard, die <sup>3</sup>H-Thymidin-Methode, oder neuere Assays die das Nukleosidanalogen Bromdesoxyuridin (BrdU) als Marker einsetzen. Die Verfahren in der zweiten großen Gruppe nutzen die Stoffwechselaktivität vitaler Zellen. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem die auf der Reduktion von Tetrazoliumsalzen basierenden Verfahren. Diese Reaktion ist von den pyridinhaltigen Cofaktoren NADH und NADPH abhängig, die durch zelluläre Enzyme des endoplasmatischen Retikulums bereitgestellt und regeneriert werden müssen (Berridge and Tan, 1993). Da diese Stoffwechselleistung nur von metabolisch aktiven Zellen erbracht werden kann und unabhängig davon ist, ob die Zelle DNA synthetisiert, können Abweichungen zu DNA-basierten Messverfahren auftreten.

Da unsere Arbeitsgruppe bereits bei vorangegangenen Experimenten die FGF-2-induzierte Proliferation von TFBs mit einem BrdU-basierten Verfahren nachweisen konnten (Grgic *et al.*, 2009), wurde sich in der vorliegenden Arbeit für ein stoffwechselbasiertes Assay entschieden. So können einerseits retrospektiv mögliche Unterschiede zwischen diesem und dem DNA-Synthesebasierten

Verfahren aufgezeigt werden und gleichzeitig Aussagen über die metabolische, zelluläre Aktivierung ermöglicht werden (Gerlier and Thomasset, 1986). Das eingesetzte Verfahren wurde 1983 von Tim Mosmann erstbeschrieben und verwendet das Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) (Mosmann, 1983). Im Reaktionsverlauf wird das gelbe, wasserlösliche MTT von stoffwechselaktiven Zellen zu violetter, wasserunlöslichem Formazan reduziert, das in Kristallform ausfällt. Nach Lösung in Alkohol kann der entstehende Farbumschlag photometrisch quantifiziert werden.



**Abbildung 10:** Reduktion von MTT zu Formazan. (Abbildung dem Herstellerprotokoll entnommen)

#### 2.3.4.1 MTT-Proliferationsassay:

Zur Durchführung des Assays wurden TFBs in Mangelmedium kultiviert, bei 80%iger Konfluenz mit Trypsin 0.5% gelöst, in PBS +/- gewaschen und in einer Zählkammer nach Neubauer gezählt. Pro Well einer 96-Wellplatte wurden 1000 Zellen in Mangelmedium eingesät ( $t_0$ ). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24h ( $t_1$ ) und 48h ( $t_2$ ) erfolgte die Stimulation durch Zugabe von 1ng FGF-2 gelöst in 10µl PBS (FGF-2-Gruppe) bzw. nur 10µl PBS (Kontrollgruppe) in jedes Well. Dies entspricht einer FGF-2-Konzentration von 1ng/100µl/Well = 10ng/ml. Nach 72h ( $t_3$ ) wurden 12µl MTT hinzugegeben. Nach erneuter Inkubation für 4h bilden sich Formazankristalle. Durch anschließende Zugabe von 100µl des Lösungsreagenz (10% SDS in 0,01M HCL) und Inkubation für weitere 24h werden diese aufgelöst. Danach wurde die Absorption [A<sub>550nm</sub> – A<sub>690nm</sub>] spektrophotometrisch in einem Multiplate-EIA-Reader gemessen. Auf jeder Platte

wurden acht Wells als Leerkontrolle (*blank*, keine MTT-Zugabe) mitgeführt. Zur Auswertung wurde deren mittlerer Leerwert von der Absorption der gefüllten Wells abgezogen. Die so ermittelten Absorptionswerte der FGF-2-Gruppe und der Kontrollgruppe wurden mittels zweiseitigem, zweiseitigem t-Test verglichen. Das Experiment wurde in drei Serien durchgeführt. Es gingen  $3 \times (96-8) = 264$  Wells, also 132 Wells pro Gruppe in die Auswertung ein.

## **2.3.5 Genexpressionsuntersuchungen – Quantitative real-time PCR**

### **2.3.5.1 Methodische und mathematische Grundlagen der quantitativen PCR**

Die quantitative, in Echtzeit messende (eng: *real-time*) Polymerasekettenreaktion (kurz: qPCR) ist eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren wie beispielsweise *messenger-RNA* (mRNA). Anhand der Konzentration einer spezifischen mRNA können unter gewissen Voraussetzungen Rückschlüsse auf die Expression des entsprechenden Gens gezogen werden. Dazu wird die gesamte aus den Zellen isolierte RNA zunächst per reverser Transkription in eine stabile Form, komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Gesamtheit aller umgeschriebenen RNA-Moleküle wird als cDNA Bibliothek bezeichnet. Da die reverse Transkription mit unspezifischen Primern durchgeführt wird, werden alle vorliegenden RNA-Moleküle in gleichem Ausmaß umgeschrieben, ihre Mengenverhältnisse bleiben also auch in der cDNA Bibliothek erhalten. Das ist eine wichtige Voraussetzung für die spätere Quantifizierung. Aus der vorliegenden cDNA werden anschließend die Zielsequenzen mit spezifischen Primern in einer erneuten PCR Reaktion vervielfältigt. Die so entstehenden, spezifischen cDNA Amplifikate der Zielsequenzen bilden cDNA-Doppelstränge, die sich später Quantifizieren lassen. Während dieser Reaktion wird neben den zu untersuchenden mRNAs stets eine endogene Kontrolle mitgeführt, deren Expression in den Zellen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen, in diesem Fall also mit und ohne Stimulation mit Wachstumsfaktoren, konstant hoch ist (sog. *housekeeping* Gene). Für die Quantifizierung stehen dann zwei farbstoffbasierte Verfahren zur Verfügung: Die Quantifizierung mittels sequenzspezifischer TaqMan-Sonden und die Reaktion mit *SYBR Green*. Für die

Quantifizierung der MicroRNAs wurde ein TaqMan-basiertes Verfahren gewählt (s.u.), die qPCR zur Quantifizierung der mRNAs erfolgte mit SYBR Green. Bei diesem Verfahren sind der PCR Lösung zwei Farbstoffe zugesetzt: SYBR Green fluoresziert bei der Bindung an doppelsträngige DNA. ROX dient als passive Referenz, deren Fluoreszenz sich während der Reaktion nicht ändert. Während der Amplifikation der Zielsequenzen erhöht sich mit der zunehmenden Konzentration der doppelsträngigen cDNA auch die Fluoreszenz von SYBR Green. Diese wird nach jedem Amplifikationszyklus gemessen und bei der anschließenden Datenanalyse gegen Fluoreszenz von ROX normalisiert, um Fehler durch unterschiedliche Konzentrationen oder Füllmengen in den Wells zu korrigieren. Nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz (*baseline*) von dieser normalisierten Fluoreszenz  $R_n$  (*reporter normalized*) erhält man  $\Delta R_n$ . Trägt man diese in einem Diagramm gegen die Anzahl der Reaktionszyklen auf, kann man anhand der Replikationskurve einen Grenzwert festlegen, bei dem die Reaktion in die exponentielle Phase übergeht. Der Reaktionszyklus, bei dem die Reaktion diesen Grenzwert überschreitet, wird als *cycle of threshold* (Ct) bezeichnet (siehe Abbildung 11+12). Der *cycle of threshold* (Ct) ist ein relatives Maß für die Konzentration der Zielnucleinsäure zu Beginn der Reaktion, wobei eine höhere Nucleinsäurekonzentration zu einer Detektion in einem früheren Zyklus und somit zu einem niedrigen *cycle of threshold* (Ct) führt. Die relative Quantifizierung der Genexpression in den beiden Experimentalgruppen erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode: Zunächst wird dazu vom Ct des Zielgens in beiden Experimentalgruppen der Ct der endogenen Kontrolle abgezogen:

$$\Delta Ct = Ct_{KCNN4} - Ct_{GAP}$$

Anschließend können die  $\Delta Ct$ -Werte der beiden Experimentalgruppen subtrahiert werden:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{FGF2} - \Delta Ct_{Ctl}$$

Das Ergebnis wird als *fc* (eng: *foldchange*) angegeben, indem die relative Menge der Ziel-mRNA (KCNN4) in der Experimentalgruppe (FGF-2) und der Kontrollgruppe

(ctl) (beide jeweils normalisiert zur endogenen Kontrolle GAPDH) zueinander ins Verhältnis gesetzt werden.

$$fc = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Die Ergebnisse werden als  $\Delta Ct \pm$  Standardabweichung angegeben. Die relative Genexpression - nach Normalisierung zur endogenen Kontrolle und relativ zu einem Referenzwert (*calibrator*, hier: der Mittelwert der Kontrollgruppe) - wird als RQ nach der Formel

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

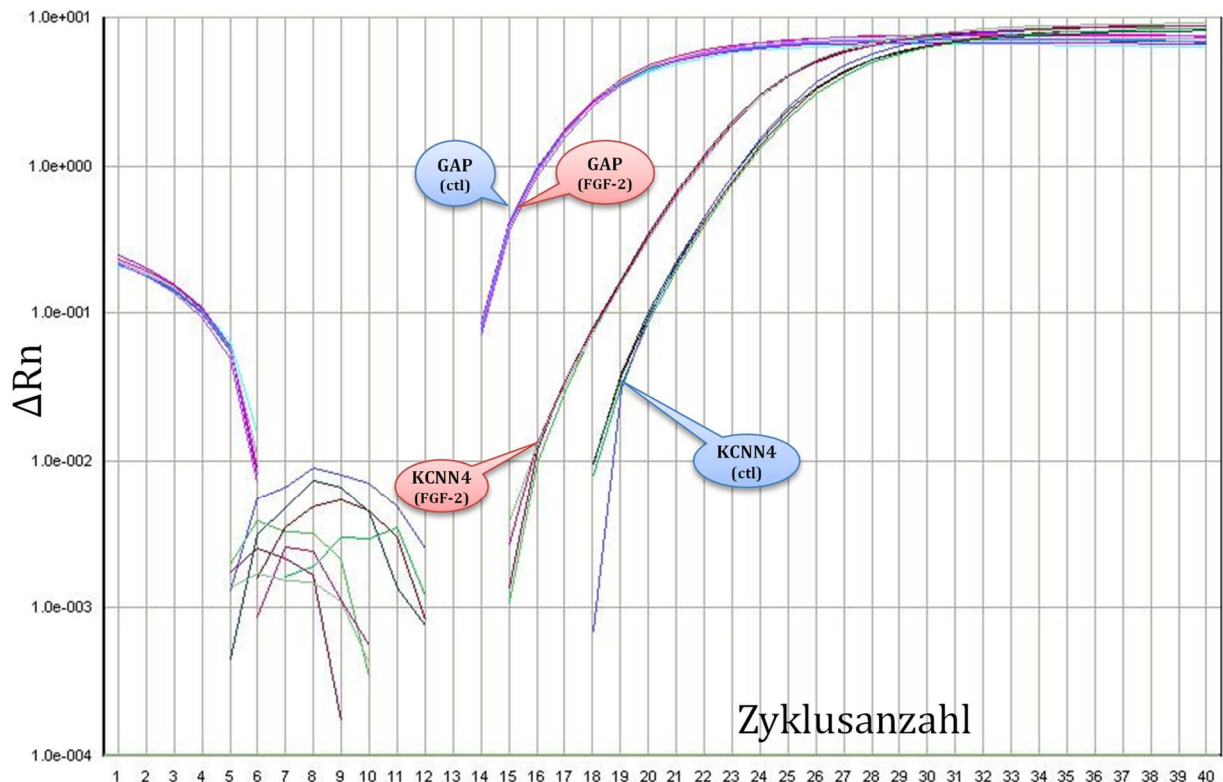
angegeben.

Hierzu werden die Ober- und Untergrenze eines probenspezifischen Konfidenzintervalles nach der Formel

$$RQ(max/min) = 2^{-\Delta\Delta Ct \pm T \times SD_{\Delta Ct}}$$

ermittelt und als Fehlerindikator aufgetragen.

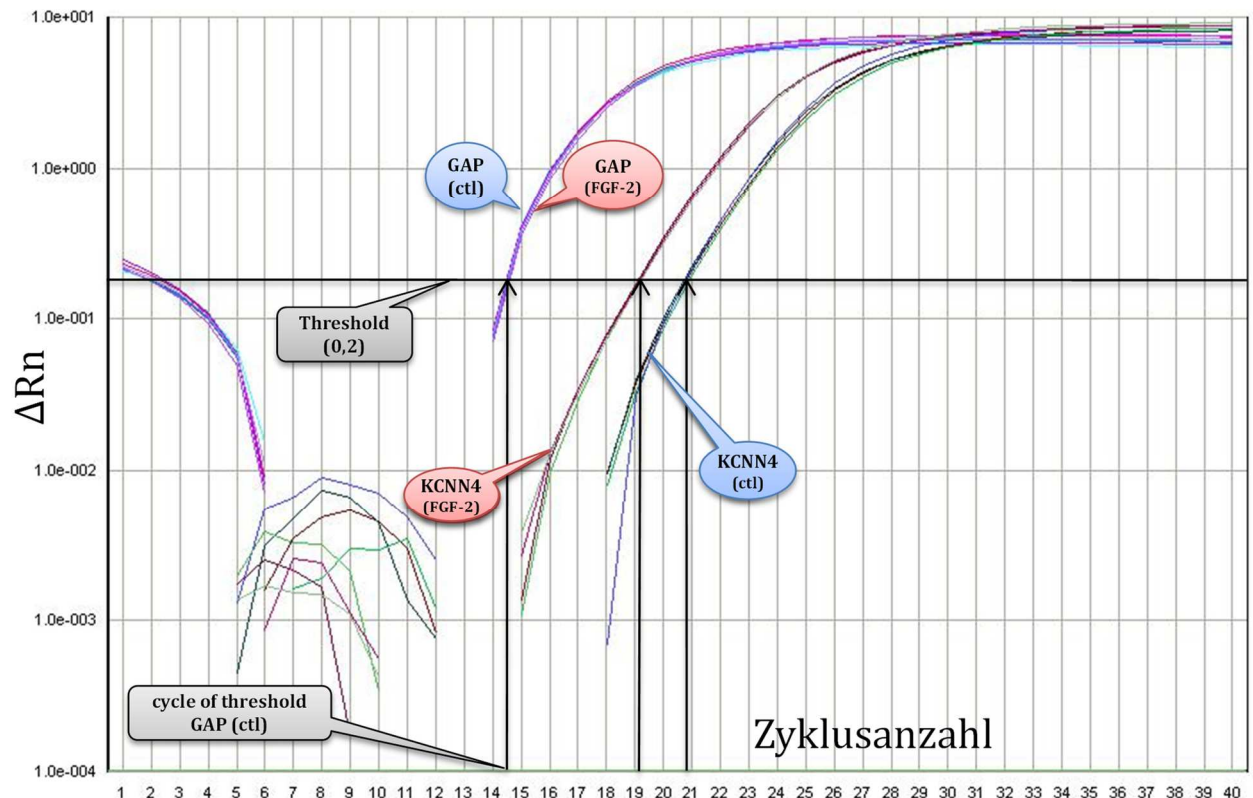
## Repräsentative Amplifikationskurven einer real-time qPCR: $\Delta Rn$ vs. Zyklusanzahl (Ziel: KCNN4; Kontrolle: GAP)



**Abbildung 11:** Repräsentative, quantitative real-time PCR. Darstellung der Amplifikationskurven des Zielgens KCNN4 und der endogenen Kontrolle GAP je einer Probe aus der FGF-2- und der Kontrollgruppe. Je 4 Ansätze pro PCR entsprechen 4 verschiedenfarbigen Kurven je Probe. X-Achse:  $\Delta Rn$  (logarithmische Skala). Y-Achse: Amplifikationszyklus (linear). Bis einschl. Zyklus 12: Hintergrundsignal. Ab Zyklus 14: Exponentielle Signalzunahme der GAP-PCR. Die zwei Scharen für GAP mit je vier Kurven aus Kontroll- und FGF-2-Probe laufen übereinander und demonstrieren die gute Reproduzierbarkeit. Ab Zyklus 15 Detektion des KCNN4-Signals in der FGF-2-Probe. In der Kontrollprobe lässt sich das KCNN4-Signal erst ab Zyklus 18 nachweisen.

Hierbei steht SD für die Standardabweichung der vier technischen Replika (vierfacher PCR Ansatz) einer Probe und T für das Konfidenzlevel unter Berücksichtigung des Ergebnisses des t-Tests und dem globalem Freiheitsgrad (eng: *global DOF, degree of freedom*) der vier Reaktionen.

## Repräsentative Amplifikationskurven einer real-time qPCR: $\Delta Rn$ vs. Zyklusanzahl (Ziel: KCNN4; Kontrolle: GAP)



**Abbildung 12:** Darstellung des Grenzwertes (*Threshold*) und des Zyklus bei Grenzwertüberschreitung (*cycle of threshold, Ct*). Ablesebeispiel: Der Ct für GAP ist der Y-Wert des Schnittpunktes der GAP-Amplifikationskurven mit dem Threshold (erster vertikaler Pfeil von links). Die Hilfslinien wurden nachträglich zur Illustration der Methode manuell eingefügt. Messwerte: Threshold für alle Proben: 0,2. Proben: ctl: Nr. 157 (Kontrollgruppe): Cycle of threshold (Ct)<sub>(GAP)</sub>: 14,36. Ct<sub>(KCNN4)</sub>: 20,92. FGF-2: Nr. 164 (FGF-2-Gruppe): Ct<sub>(GAP)</sub>: 14,38. Ct<sub>(KCNN4)</sub>: 19,21.

Zur Signifikanzkontrolle des Vergleichs der beiden Experimentalgruppen wurde ein zweiseitiger, zweiseitiger t-Test durchgeführt. Werte für  $p < 0.05$  wurden als signifikant, Werte für  $p < 0.001$  als hochsignifikant angesehen.

### 2.3.5.2 Durchführung der qPCR

Die Zellen wurden im Mangelmedium auf Petrischalen kultiviert und nach o.g. Vorgehen mit FGF-2 zu den Zeitpunkten 24h und 48h stimuliert. Zum Zeitpunkt 72h erfolgte die Isolation der RNA, Synthese der cDNA-Bibliotheken und anschließende quantitative real-time-PCR. Diese Schritte werden im Folgenden detailliert beschrieben.



#### 2.3.5.2.1 RNA-Isolation

Die Fibroblasten werden auf Petrischalen bis ca. 80%iger Konfluenz kultiviert. Zunächst werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber von der Petrischale entfernt. Nach Zentrifugation (5min, 4°C bei 2100rpm) wird das Pellet in 200µl PBS gelöst. Es folgt die Zugabe von 400µl Lysepuffer (4,5M Guanidin-HCl, 50mM Tris-HCl, 30% Triton X-100 (w/v), pH 6,6 bei 25°C) und Vermischung der Probe für 15s mittels eines Vortexmischers. Nun wird das Lysat in ein mit einem Glasfaserfilter ausgestattetes Reaktionsgefäß überführt und durch den Filter zentrifugiert (8.000rpm für 15s.). Der Durchfluss wird verworfen, anschließend erfolgt ein 15minütiger DNase-Verdau der am Filter haftenden Nukleinsäuren mit 180U einer recombinanten DNase I bei Raumtemperatur. Es folgen drei Waschrritte: Zunächst mit 500µl des ersten Waschpuffers [5M Guanidin-HCl, 20mM Tris-HCl, pH 6,6], dann mit 500µl und zuletzt mit 200µl des zweiten Waschpuffers [20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7,5]. Auf jeden Waschrtritt folgt eine Zentrifugation (15s, 8000rpm). Abschließend wird die RNA mit 20µl Wasser (PCR-Grad) in ein RNase freies Eppendorfgefäß (1,5ml) eluiert und entweder sofort zur cDNA-Synthese genutzt oder bei -80°C tiefgefroren.

#### 2.3.5.2.2 cDNA Synthese:

Alle Pipettierschritte mit RNA werden auf Eis durchgeführt: In ein RNasefreies PCR-Gefäß werden zunächst 10µl RNA und 1µl Oligonukleotide (*anchored oligos*) pipettiert. Zur Deaktivierung von RNasen wird das Gefäß im Cyclyer 5 Minuten auf 70° erhitzt. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wird der Mastermix aus Reaktionspuffer (4µl 5x *Reaction Buffer*: 250 mM Tris-HCl, pH 8.3 bei 25°C, 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), Desoxyribonukleosidtriphosphaten (2µl 10mM 4dNTP Mix) und Wasser (2µl, PCR-Reinheitsgrad) hinzugegeben. Nach 5 minütiger Inkubation bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von 200 U (=1µl) der reversen Transkriptase gestartet. Nach 60 Minuten Transkription bei 42°C wird das Enzym durch 10 minütiges Erhitzen auf 70° inaktiviert. Die cDNA Bibliotheken werden auf 4°C gekühlt und entweder sofort mittels quantitativer real-time PCR untersucht oder bei -20° C tiefgefroren.

#### 2.3.5.2.3 Quantitative real-time PCR:

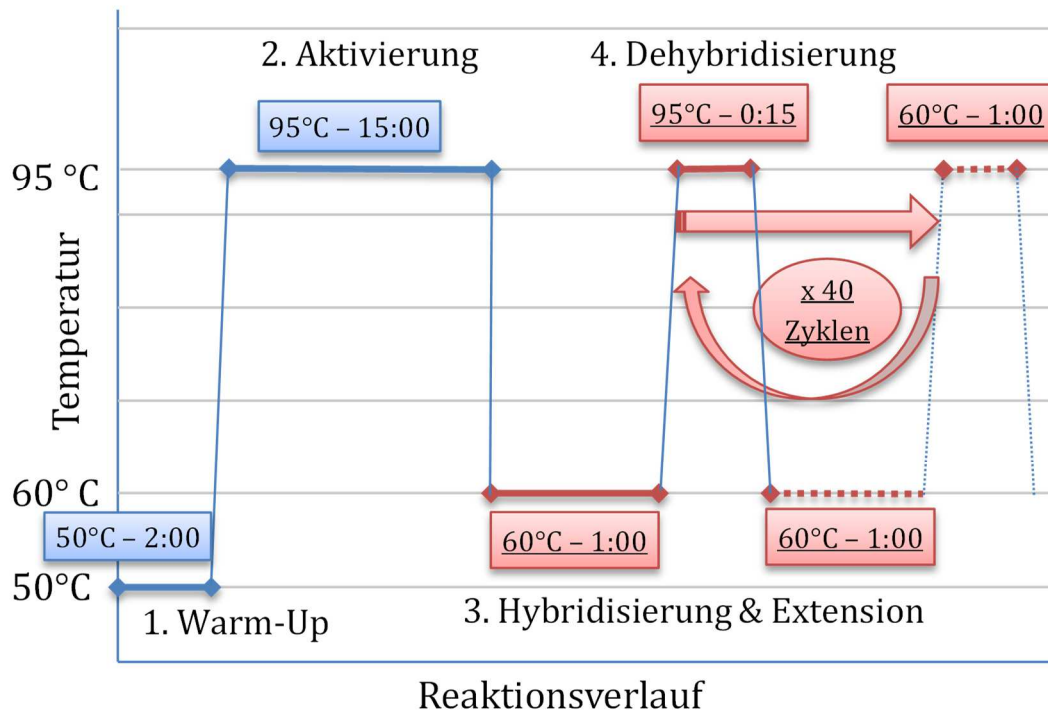
Die qPCR Experimente wurden in 96-Well-Platten durchgeführt, wobei jede cDNA Probe vier Mal aufgebracht wurde (*Quadruplicate*). Pro Well wurden 2 µl cDNA verwendet. 4 Wells pro Platte wurden als NTC (*non target control*) mit 2µl Wasser (PCR Grad) befüllt. Danach erfolgte die Zugabe von 18µl Mastermix pro Well.

**Tabelle 7:** qPCR Mastermix

Menge	Substanz
2 µl	forward Primer
2µl	reverse Primer
4µl	Wasser, PCR Grad
10µl	Absolute Blue QPCR SYBR Green low ROX Mix: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hot-Start</i> DNA-Polymerase</li> <li>• SYBR Green I Farbstoff</li> <li>• ROX Farbstoff (passive Referenz)</li> <li>• dNTPs</li> <li>• Reaktionspuffer (inkl. MgCl<sub>2</sub> 3mM)</li> </ul>

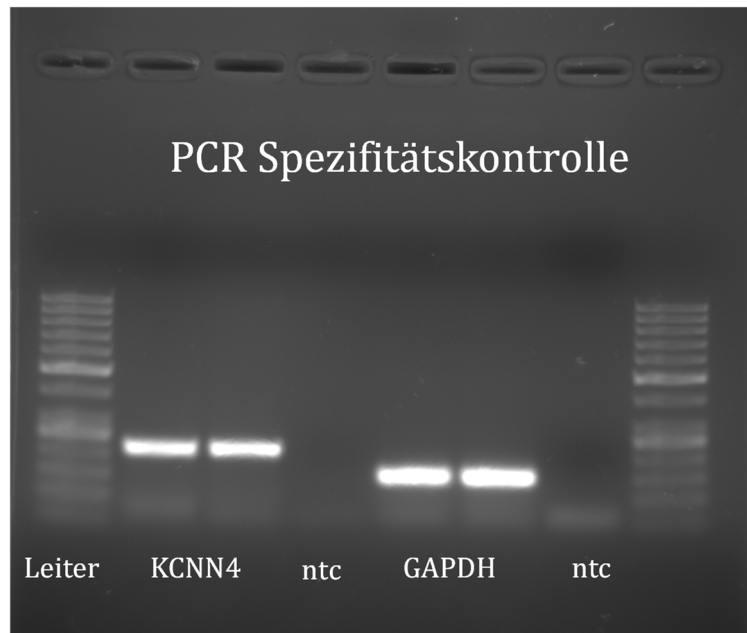
Die Platte wird mit einer Siegelfolie verschlossen, kurz anzentrifugiert und das Cyclerprogramm (siehe Abb. 13) gestartet.

## Cyclerprogramm der quantitativen PCR



**Abbildung 13:** Cyclerprogramm der quantitativen PCR (schematische Darstellung): Nach kurzem Aufwärmen (2min bei 50°C) erfolgt die Aktivierung der Polymerase (15min bei 95°C). Darauf folgen 40 PCR Zyklen mit Hybridisierung und Extension (1min bei 60°C) unterbrochen von Dehybridisierung (15sek. bei 95°C). Die Messung zur Quantifizierung erfolgte in der Hybridisierung (Schritt 3).

Nach jeder PCR Untersuchung erfolgte die Kontrolle der Spezifität des Amplifikats im Agarosegel.



**Abbildung 14:** Repräsentative Gelelektrophorese der Amplifikate von zwei qPCR Proben. V.l.n.r.: DNA-Leiter, zwei Proben nach qPCR mit KCNN4-Primer. KCNN4 non-target control. zwei Proben nach qPCR mit GAPDH-Primer. GAPDH non-target control. DNA-Leiter.

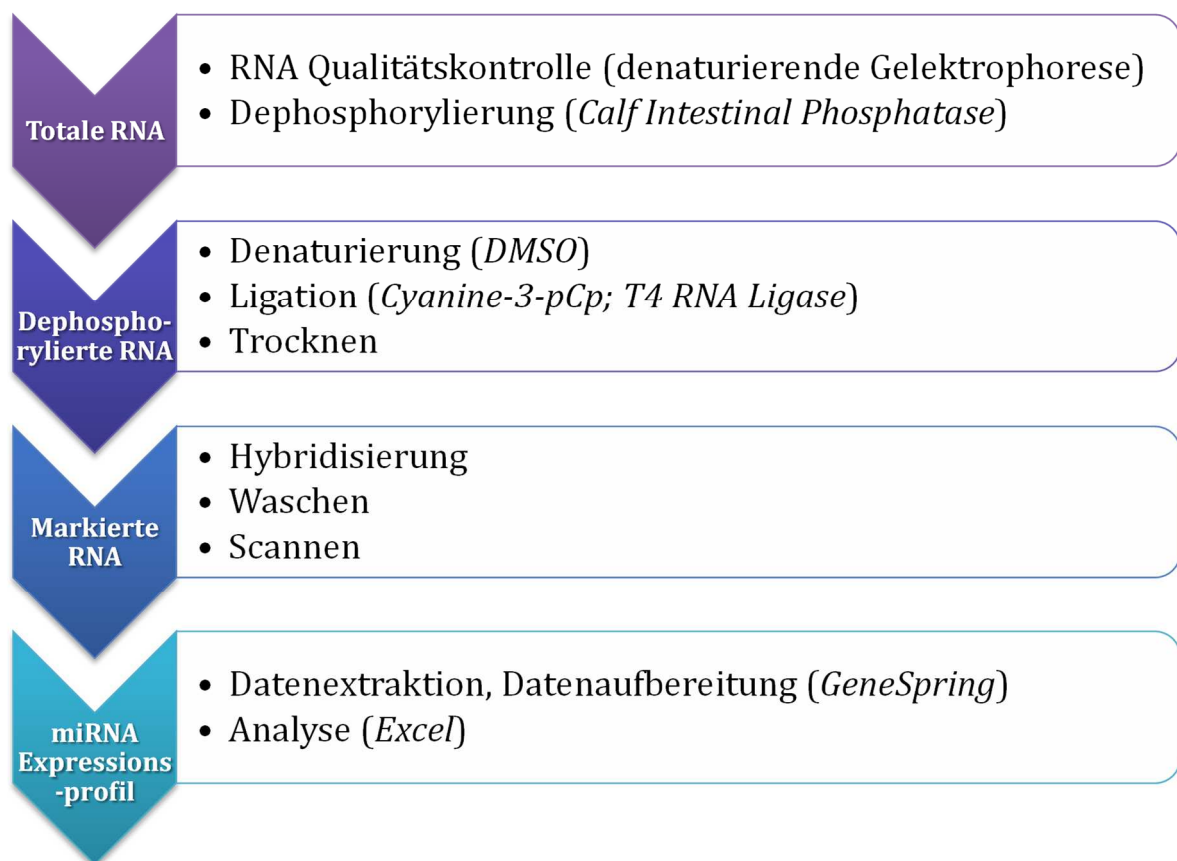
### 2.3.6 MicroRNA Untersuchungen

Zur Untersuchung ob die Heraufregulation des KCNN4 in diesem FGF-2-abhängigen Modell durch microRNAs beeinflusst wird, wurde das Expressionsprofil von microRNAs in einer FGF-2-stimulierten Gruppe mit einer Kontrollgruppe in einem microRNA-Microarray verglichen. Änderte sich die Konzentration einer microRNA durch die Stimulation mit FGF-2 im Vergleich zur Kontrollgruppe mindestens um den Faktor 2 ( $fc \geq 2$ ) und war die Signifikanz der Messungen dabei mindestens  $p=0.08$ , wurde diese MicroRNA als signifikant expressionsverändert (*differentially regulated*) eingestuft.

Alle expressionsveränderten MicroRNAs wurden anschließend mit Hilfe bioinformatischer Algorithmen daraufhin untersucht, ob sie eine potentielle Bindungsstelle in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) des KCNN4-Gens oder eines Upstream-Regulators aufweisen. Hierzu wurden die weit verbreiteten und öffentlich zugänglichen Programme PicTar (Krek *et al.*, 2005) und TargetScan (Friedman *et al.*, 2009) verwendet.

### 2.3.6.1 MicroRNA Expressionarray

Das Micro-RNA-Microarray wurde gemeinsam mit Dr. Thomas Krause in den Räumen der *MicroArray Core Facility* am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Die Stimulation der Zellkulturen und die RNA-Isolation erfolgten nach oben genanntem Vorgehen aus je fünf biologischen Replikaten pro Experimentalgruppe. Nach der RNA Isolation mit dem Trizol Reagenz (nach Herstellerprotokoll) und einer Qualitätskontrolle mit denaturierender Gelelektrophorese (siehe Ergebnisteil) erfolgte die Hybridisierung der vier Proben mit höchster RNA-Qualität jeder Gruppe auf den *single-slide Agilent Mouse miRNA Microarray Release 15.0 8x15K* Chip. Die Prozessierung hierzu erfolgte nach dem in Abb. 12 dargestellten Ablauf entsprechend den Vorgaben des Herstellerprotokolls.



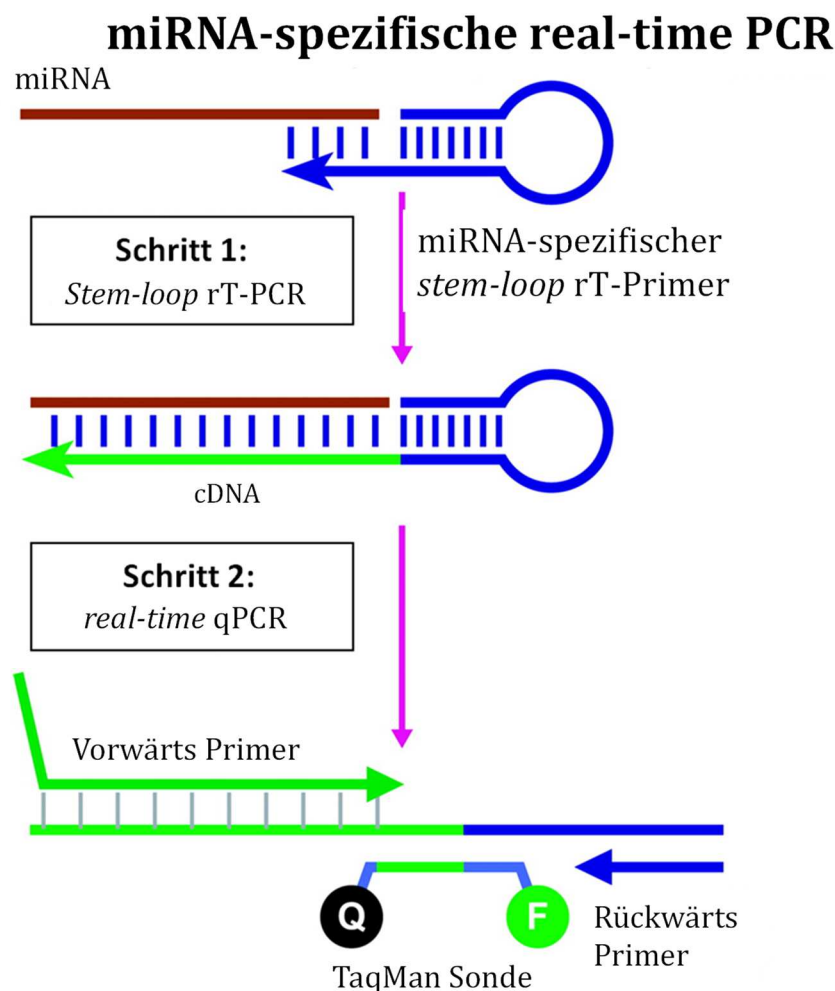
**Abbildung 15:** Schematischer Ablauf des miRNA-Microarrays. (modifiziert nach (Agilent Technologies, 2015))

Das Auslesen erfolgte mittels eines Agilent Technologies Scanners der Version G2505C (US83203533). Zur Datenanalyse kam die Software Gene Spring Multi-

Omic Analysis (Agilent) in der jeweils aktuellsten Version (zuletzt 14.5) zum Einsatz. Zur weiteren Aufbereitung wurde Microsoft Excel (Version 2007) herangezogen.

### 2.3.6.2 Quantitative, microRNA spezifische, real-time PCR

Die Quantifizierung von MicroRNAs ist aufgrund ihrer Kürze und der damit eingeschränkten Primerbindungsfähigkeit anspruchsvoll. Für die Experimente dieser Arbeit wurde dazu ein auf TaqMan-Sonden basiertes Assay mit miRNA spezifischen *stem-loop-rt*-Primern etabliert (Chen *et al.*, 2005).



**Abbildung 16:** Schematischer Reaktionsablauf der MicroRNA-Quantifizierung: Im ersten Schritt erfolgt die reverse Transkription nach Bindung des *stem-loop-rtT*-Primers an das 3'-Ende der MicroRNA. Die synthetisierte cDNA wird anschließend im 2. Schritt in einer real-time PCR Reaktion mit zwei flankierenden Primern amplifiziert und mit spezifischen TaqMan Sonden detektiert. (Chen *et al.*, 2005)

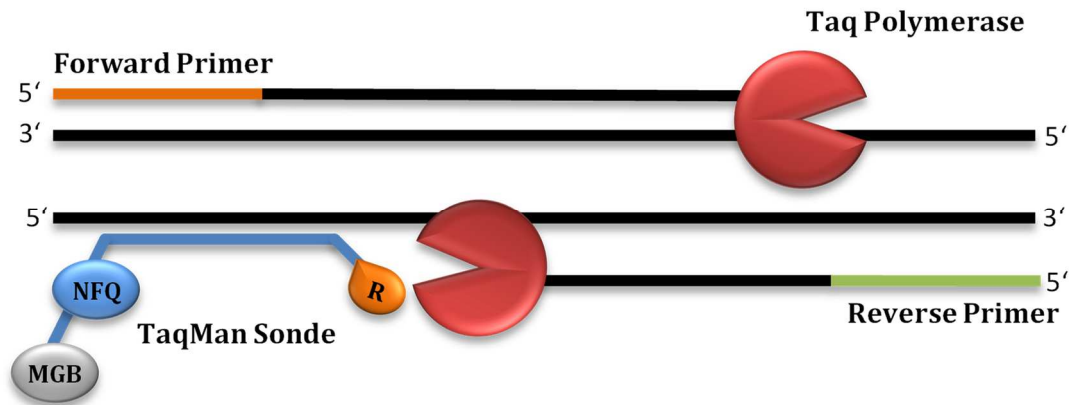
Zunächst erfolgt die reverse Transkription (rT) mittels MicroRNA-spezifischer *stem-loop-rT*-Primer. Diese bilden aufgrund ihrer Nukleotidsequenz eine Sekundärstruktur aus, die aus einem basengepaarten "Stamm" und einer "Schleife" ohne Basenpaarung besteht. Am Beginn des "Stammes" kann mit dem überstehenden Ende des einen Stranges durch Basenpaarung das 3'-Ende einer MicroRNA spezifisch gebunden werden. In dieser Konfiguration ist eine ausreichend lange Bindungsstelle vorhanden, an der die reverse Transkriptase die Synthese einer cDNA initiieren kann.

Diese Methode basiert auf dem Einsatz spezieller Oligonukleotidsonden, an deren 5' Ende sich ein fluoreszierender Farbstoff (ein 6-Carboxyfluoresceinderviat, FAM), der sog. *Reporter*, und am 3'-Ende ein in diesem Fall nicht fluoreszierender sog. *Quencher* befindet.



**Abbildung 17:** TaqMan Sonde: Die Sonden tragen am 5'-Ende den Reporterfarbstoff FAM (R), am 3'-Ende einen nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ) und außerdem einen sog. *minor groove binder* (MGB) zur Erhöhung der Schmelztemperatur. (Eigene Darstellung nach dem Herstellerprotokoll)

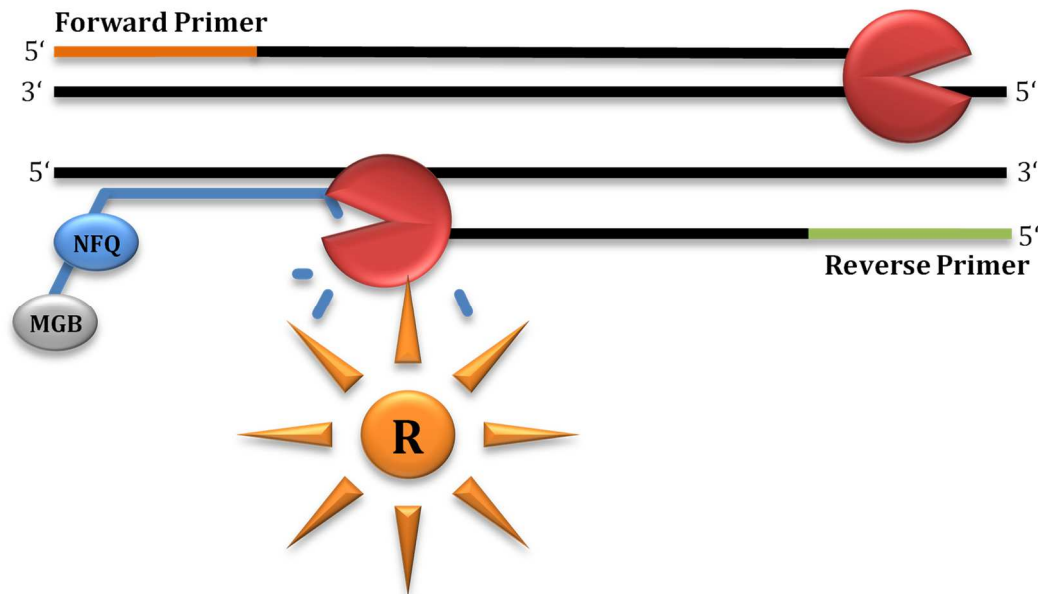
Wird die intakte Sonde durch Einstrahlung einer spezifischen Wellenlänge (bei FAM: 488nm) zur Fluoreszenz angeregt, wird die Energie auf Basis des von Förster beschriebenen Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET) auf den Quencher übertragen und kein Signal emittiert (Förster, 1948).



**Abbildung 18:** Förster-Resonanzenergietransfer: Bei intakter Sonde sind sich Reporter und Quencher räumlich nah. Wird der Reporter nun zur Fluoreszenz angeregt wird die Energie durch Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) auf den nicht-fluoreszierenden Quencher übertragen. Es entsteht kein Signal. (Eigene Darstellung nach dem Herstellerprotokoll)

Ist die Sonde während der Amplifikation an Ihre Zielsequenz hybridisiert wird bei Kontakt mit der TaqPolymerase durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität des Enzyms der Reporter von der Sonde abgeschnitten. Die räumliche Nähe zum Quencher geht verloren, wodurch die Energie bei Einstrahlung der Anregungswellenlänge nicht mehr durch FRET übertragen werden kann. Der Reporterfarbstoff emittiert nun ein detektierbares Signal.





**Abbildung 19:** Signaldetektion: Ist die Sonde während der Amplifikation an Ihre Zielsequenz hybridisiert wird der Reporter von der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der TaqPolymerase von der Sonde getrennt. Die räumliche Nähe zum Quencher geht verloren und der FRET wird unterbunden. Bei Einstrahlung der Anregungswellenlänge kann die Energie nicht mehr mittels FRET auf den Quencher übertragen, sondern die Fluoreszenz des Reporters kann nun detektiert werden. Sie steigt proportional zur Menge des Amplikons in der Reaktion an. Anschließend dehybridisiert die Sonde und die Amplifikation läuft weiter (nicht gezeigt). (Eigene Darstellung nach dem Herstellerprotokoll)

Die Sonden können nur nach der Hybridisierung an Ihre spezifische Zielsequenz von der Polymerase gespalten werden. Da der Zielstrang in der PCR mit jedem Zyklus amplifiziert wird, steigt die Anzahl der Bindungsstellen und daher auch die Fluoreszenz aller abgespaltenen Reporterfarbstoffe in der Reaktion proportional zur Menge des Amplikons an. So lässt sich auch in diesem Fall die relative Amplikonmenge mit der oben beschriebenen  $\Delta\Delta C_t$ -Methode ermitteln.

Als endogene Kontrolle wurde mit der snoRNA202 eine ebenfalls kurze RNA verwendet, die sich aufgrund ihrer stabilen Expression in verschiedenen Mausgeweben besonders gut als Kontrolle eignet. (Wong *et al.*, 2007) Dem Primerdesign liegt die zum Zeitpunkt der Experimente aktuelle mirbase Version 15 zu Grunde. Vor Beginn der Reaktion erfolgte eine Qualitätskontrolle und Konzentrationsmessung der RNA mittels NanoDrop. Anschließend wurde für die reverse Transkriptionsreaktion eine Konzentration der RNA von 100ng/5µl eingestellt.

**Tabelle 8:** Reaktionsmischung der microRNA-spezifischen reversen Transkriptasereaktion

Komponenten	Volumen (pro 15µl Reaktion)
2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphatmix (dNTPs 100mM, inkl. dTTP)	0,15 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1,00 µl
RNase Inhibitor (20U/µl)	0,19 µl
Reaktionspuffer	1,5 µl
Nuklease-freies Wasser	4,16 µl
Summe	7 µl

Die Reaktion wird in RNasefreien PCR-Gefäßen durchgeführt, in die zunächst 100ng/5µl RNA vorgelegt werden. Nach der Zugabe von 7µl Mastermix werden 3µl der microRNA-spezifischen Primer zugegeben. Die Reaktionsgefäße werden anschließend für 5min auf Eis inkubiert, dann in den Cycler überführt und die reverse Transkription gestartet.

**Tabelle 9:** Reaktionsablauf der reversen Transkriptionsreaktion

Dauer	Temperatur (°C)
30 min	16
30 min	42
5 min	85
Bis zur Entnahme	4

**Tabelle 10:** Zielsequenzen der microRNA-spezifischen stem-loop-Primer

Primername	Einsatz als	Zielsequenz:
miR-503	Ziel	UAGCAGCGGGAACAGUACUGCAG
snoRNA202	Endogene Kontrolle	GCTGTACTGACTTGATGAAAGTACTTTTGAACCTTTTCCATCTGATG

Die so synthetisierte cDNA wird unmittelbar mit der quantitativen real-time PCR analysiert. Zunächst wird für jedes Ziel (mmu-miR-503 und snoRNA202) ein Mastermix hergestellt.

**Tabelle 11:** Reaktionszusammensetzung der MicroRNA-spezifischen quantitativen real-time PCR.

Komponente	Volumen
TaqMan™ MicroRNA -Assay (20x)	1,00 µl
• MicroRNA spezifische Primer und TaqMan™ Sonden	
cDNA (Produkt aus der vorangegangenen RT-Reaktion)	1,33 µl
TaqMan™ Universal PCR Master Mix II, no UNG (2x)	10,00 µl
• AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, UltraPure	
• dNTPs (inkl. dUTP)	
• ROX (passiver Referenzfarbstoff)	
• Reaktionspuffer	
Nuklease-freies Wasser	7,67 µl
Summe	20 µl

Anschließend wird für jede cDNA Probe die Reaktionsmischung vierfach auf eine 96-Well qPCR-Platte aufgebracht (*quadruplicate*). Die Platte wird versiegelt, anzentrifugiert und die Reaktion mit dem unten angegebenen Protokoll im real-time Cyclor gestartet.

	<b>Enzymaktivierung:</b>	<b>PCR:</b>	
	<b>Einmalig zu Beginn</b>	<b>Wiederholung 50 Zyklen</b>	
		Denaturierung	Hybridisierung Polymerisation Messung
<b>Temperatur</b>	95°C	95°C	60°C
<b>Zeit</b>	2 min	15 sek.	60 sek.

**Tabelle 12:** Reaktionsablauf der MicroRNA-spezifischen qPCR

Die Datenauswertung erfolgte analog zur mRNA-qPCR mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode (siehe oben).

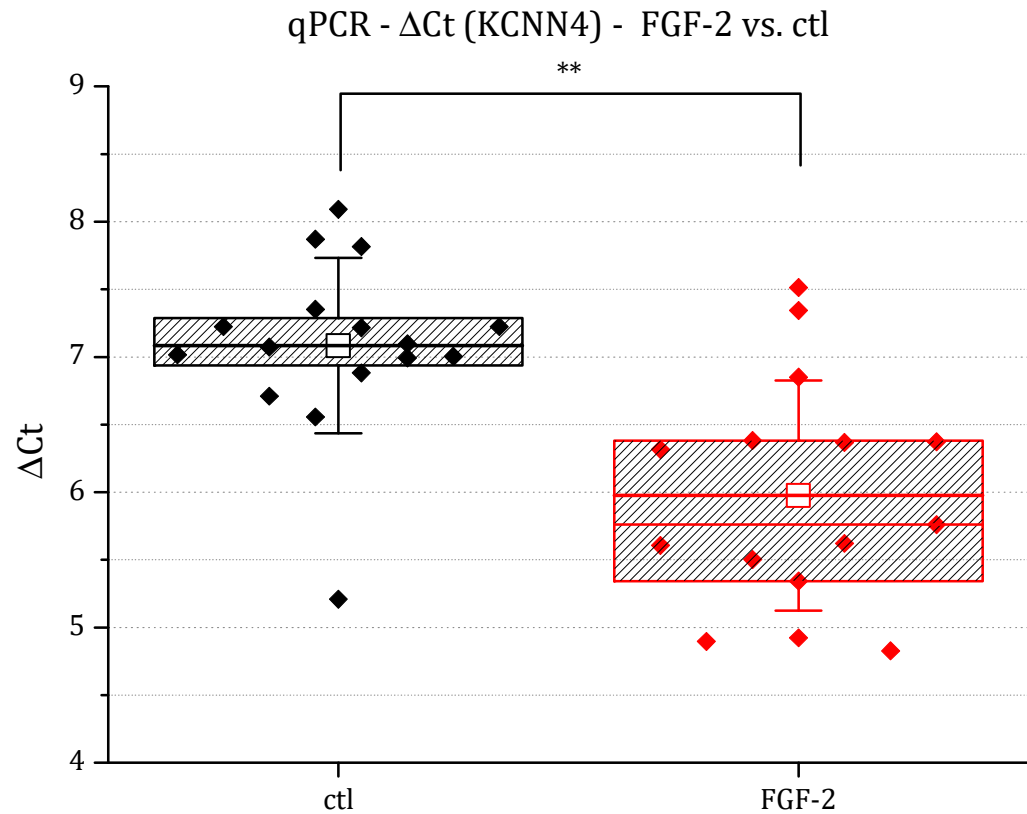
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Kanalexpression

Die Expression des KCNN4 wurde molekularbiologisch und funktionell untersucht. Die molekularbiologischen Untersuchungen erfolgten auf mRNA-Ebene durch quantitative real-time PCR. Die funktionellen Tests erfolgten auf Proteinebene durch *Patch Clamp* Messungen der kanalspezifischen, transmembranösen Ströme.

#### 3.1.1 Molekularbiologische Expressionsuntersuchungen

Die quantitative real-time PCR wurde in drei Versuchsserien durchgeführt, die Ergebnisse gepoolt und gemeinsam analysiert. Die Auswertung der  $\Delta C_t$ -Werte der beiden Gruppen zeigte zunächst eine gute Korrelation der Messerwerte innerhalb der Gruppen, sichtbar an der geringen Höhe der Boxen in Abb. 20 (geringer Bereich zwischen der 25. und 75. Perzentile). Auch die Standardabweichung umfasst nur wenige Messpunkte der jeweils anderen Gruppe und reicht nicht bis zu deren 25. bzw. 75. Perzentile (den Grenzen der jeweils anderen Box) heran. Vergleicht man beide Gruppen zeigt sich eine deutliche Trennung der Gruppen mit einer relevant niedrigeren  $\Delta C_t$  (Median: 5,76) in der FGF-2 Gruppe als in der Kontrollgruppe (Median: 7,09). Nur ein Wert der Kontrollgruppe unterschreitet die 75. Perzentile der FGF-2 Gruppe. Dieser Wert separiert deutlich von den anderen Werten der Kontrollgruppe und kann als Ausreißer aufgefasst werden. Er wurde jedoch nicht von nachfolgenden Analysen ausgeschlossen. Die Signifikanztestung ergibt im t-Test ein  $p < 0.005$ .

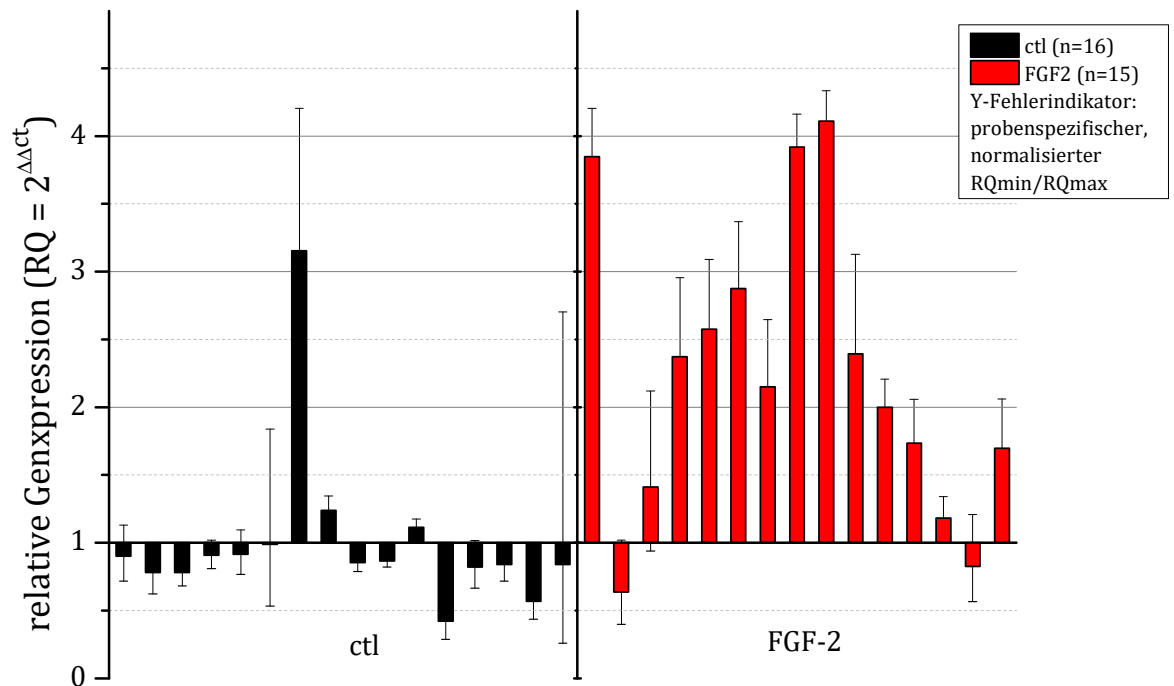


**Abbildung 20:** Darstellung der  $\Delta$ Ct nach quantitativer real-time PCR der mRNA des KCNN4-Gens bezogen auf die endogene Kontrolle GAPDH. Vergleich von Kontrollgruppe und FGF-2-Gruppe: gepoolte Analyse von 15/16 Untersuchungen aus drei Versuchsserien. 4-facher PCR-Ansatz je Probe. Grenzen der Box: 25 + 75. Perzentile; schmale Linie: Median; Quadrat: Mittelwert; Whisker:  $\pm 1$  SD. t-Test:  $p < 0,005$ .

**Tabelle 13:** quantitative real-time PCR nach Stimulation mit FGF-2 oder Vehikel (ctl)

	n	Mittelwert	SD	SE	Summe	Min	Median	Max
Ctl	16	7,0835	0,6478	0,162	113,336	5,209	7,085	8,092
FGF-2	15	5,9753	0,8501	0,212	89,629	4,827	5,761	7,514

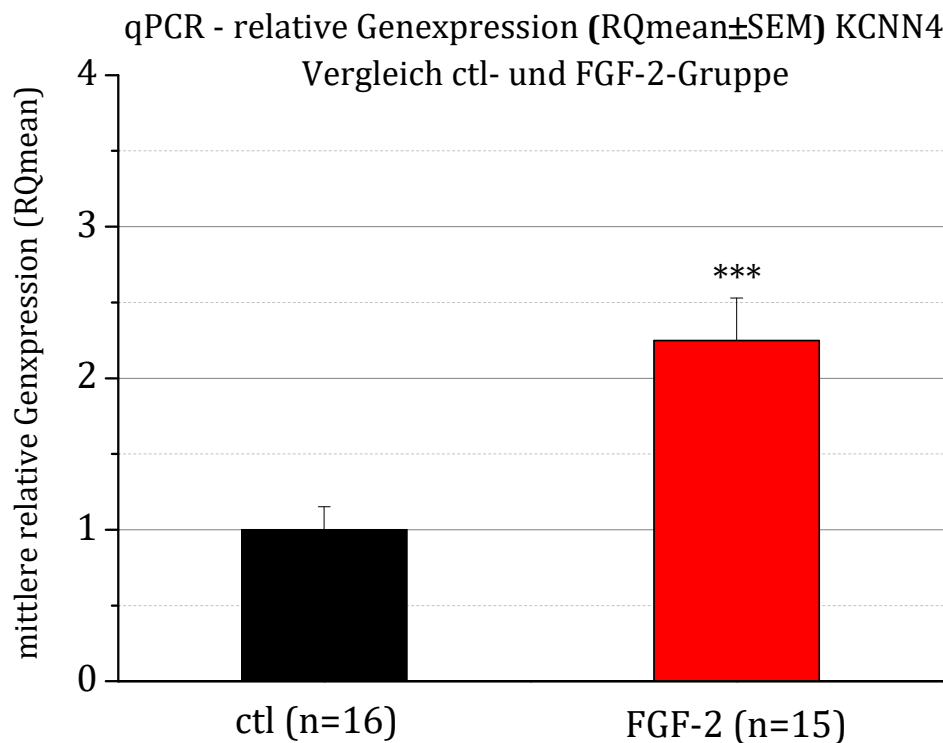
## qPCR - relative Genexpression des KCNN4 - ctl vs. FGF-2



**Abbildung 21:** relative Genexpression des KCNN4 Gens (IKCa1) in der quantitativen real-time PCR. Gepoolte Darstellung der relativen Genexpression (RQ) aller 31 Proben aus drei Versuchsserien, normalisiert auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (=1). 4-Facher PCR-Ansatz je Probe. Darstellung des individuellen Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) der vier Ansätze jeder Probe- als +/- Fehlerindikator (RQmin/RQmax, Konfidenzintervall: 95%). Lesebeispiel: In der 1. Probe der FGF-2-Gruppe findet sich eine 3,8fach-höhere Expression der KCNN4-mRNA im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollgruppe (=1). Deutlich erkennt man mit Probe 7 den deutlich separierten Extremwert der Kontrollgruppe wieder.

Abbildung 21 zeigt die relative Genexpression des KCNN4 in beiden Gruppen. Diese leitet sich durch  $RQ = 2^{\Delta\Delta C_t}$  aus der in Abb. 20 aufgetragenen  $\Delta C_t$  ab. Sie ist ein relatives Maß und wird auf den Mittelwert der Kontrollgruppe normalisiert. Deutlich zu erkennen ist mit Probe 7 ein Ausreißer der Kontrollgruppe. Sie zeigen eine überwiegend gute Korrelation der vier Wells einer Probe. Nur bei wenigen Proben weist der PCR-Mittelwert (siehe beispielhaft Probe 16 der Kontrollgruppe) aufgrund der Streuung der vier PCR Ansätze ein relevant vergrößertes Konfidenzintervall auf. Bis wenige Ausnahmen (Probe 6 der Kontrollgruppe;

Proben 2, 13 & 14 der FGF-2 Gruppe) zeigen die Proben in der FGF-2 Gruppe eine deutlich höhere KCNN4-Expression als die Kontrollgruppe.



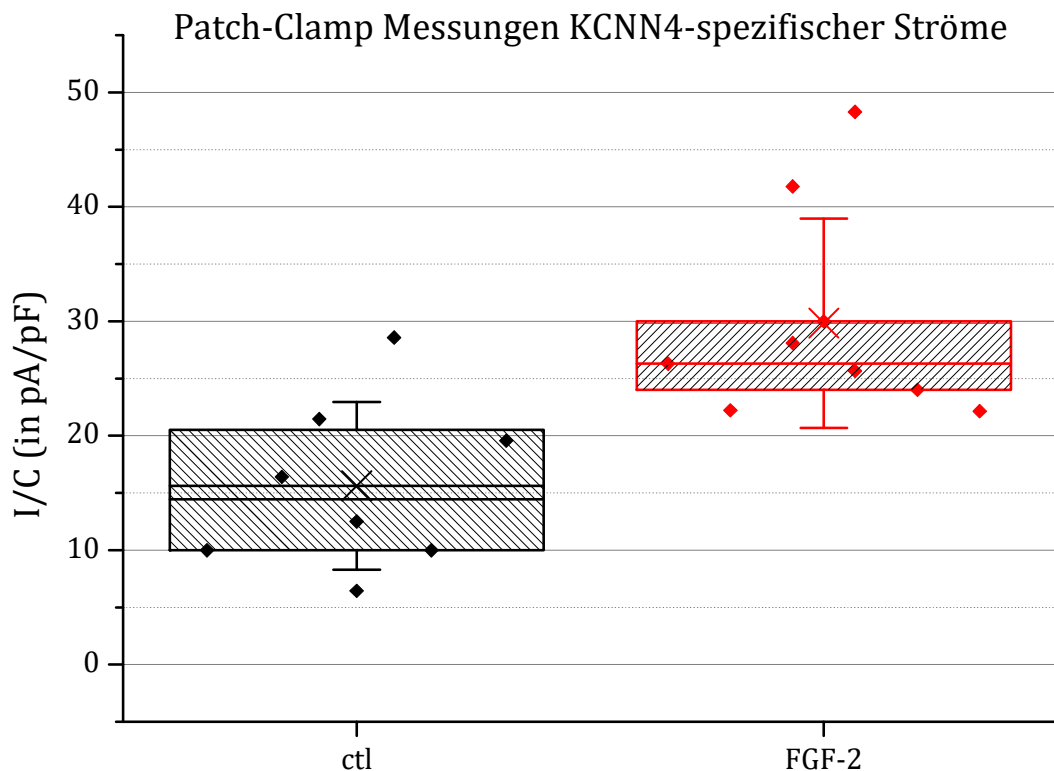
**Abbildung 22:** Vergleich der mittleren, relativen Genexpression des KCNN4-Gens (IKCa1) nach quantitativer real-time PCR. Mittelwerte der Proben aus Abb. 21 zum Vergleich von Kontroll- und FGF-2 Gruppe.  $n_{\text{ctl}}$ :15;  $n_{\text{FGF-2}}$ : 16. Darstellung der Mittelwerte + 1 SEM, normalisiert auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (=1). t-Test für Differenz der 2 Gruppen:  $p < 0,001$ .

Dies verdeutlicht Abbildung 22, die die mittlere Genexpression in beiden Gruppen nebeneinanderstellt: Die Expression des KCNN4 ist in der FGF-2 Gruppe im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 2,25 gesteigert.



### 3.1.2 Funktionelle Untersuchung der Kanalexpression – Patch-Clamp

In den funktionellen Messungen auf Proteinebene mittels Patch-Clamp zeigt sich nach profibrotischer Stimulation ebenfalls eine Heraufregulation von KCNN4 im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abb. 23).

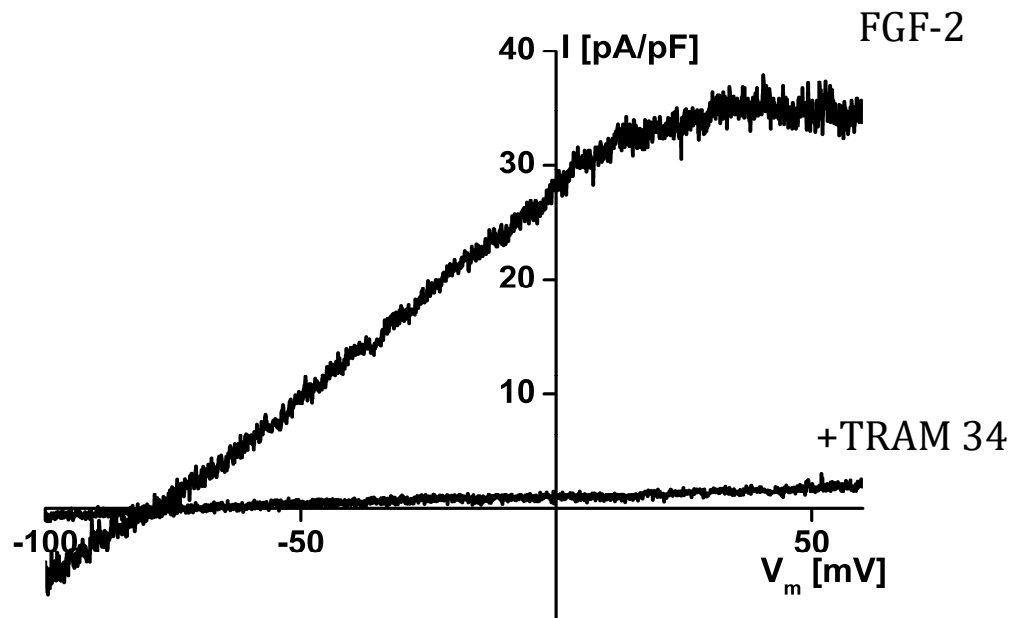


**Abbildung 23:** Messungen der Summenströme durch KCNN4-Kanäle, normiert auf die Zellmembrankapazität.  $n_{\text{ctl}}=8$ ,  $n_{\text{FGF-2}}=9$  (Grenzen der Box: 25./75. Perzentile. Linie: Median. X: Mittelwert. Whisker:  $\pm 1$  SD).

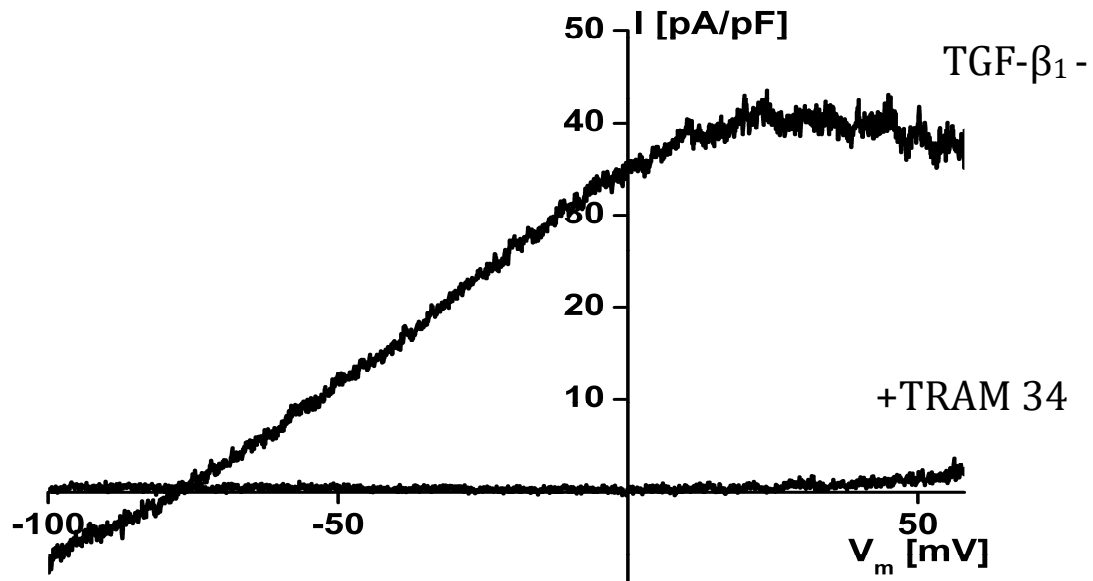
Die auf die Kapazität der Zellmembran normierten Ströme durch KCNN4-Kanäle sind in FGF-2 stimulierten Zellen um den Faktor 1,91 größer als in der Kontrollgruppe. Nur eine Messung der Kontrollgruppe reicht überhaupt in den Wertebereich der FGF-2 Gruppe herein.

Die Abbildungen 24 und 25 zeigen zwei repräsentative Einzelmessungen dieser Experimente.

Die vollständige Supprimierbarkeit des Stroms durch Zugabe des spezifischen Kanalblockers TRAM-34 beweist, dass KCNN4-Kanäle (elektrophysiologisch KCa3.1) für diese Leitfähigkeit verantwortlich sind.



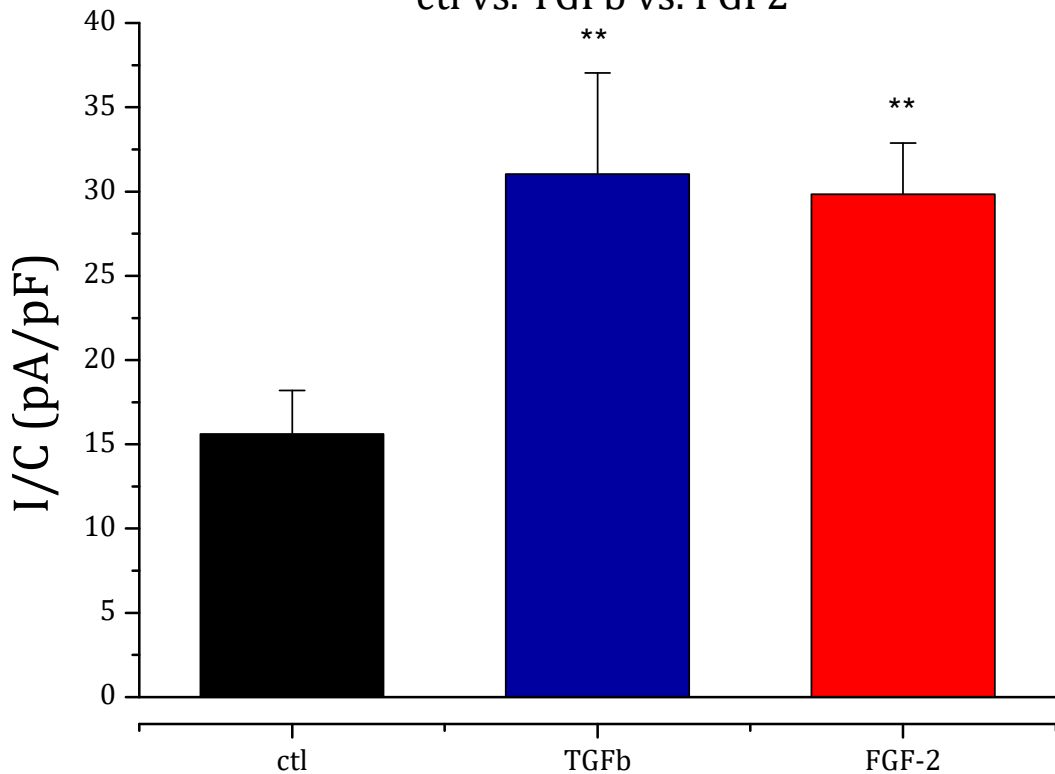
**Abbildung 24:** Originalstromaufzeichnung einer Patch-Clamp Messung: Aktivierung von KCNN4-Kanälen in FGF-2-stimulierten TFBs: Nahezu vollständige Suppression des Stroms nach Zugabe des spezifischen Kanalblockers TRAM-34. [Pipettenlösung mit  $3\mu\text{M}$  freiem  $\text{Ca}^{2+}$ . Kultur auf Mangelmedium, zweimalige Stimulation mit  $10\text{ng FGF-2/ml}$  zu den Zeitpunkten 24h und 48h, Messung nach 72h.]



**Abbildung 25:** Originalstromaufzeichnung einer Messung: Aktivierung von KCNN4-Kanälen in TFBs nach Stimulation mit TGF- $\beta_1$  (1 ng/ml): Vollständige Suppression des Stroms nach Zugabe von TRAM-34. [Pipettenlösung mit 3  $\mu$ M freiem  $\text{Ca}^{2+}$ . Kultur auf Mangelmedium, zweimalige Stimulation mit TGF- $\beta_1$  (1 ng/ml) zu den Zeitpunkten 24h und 48h, Messung nach 72h.]

Diese gesteigerte Expression der Kanalproteine durch FGF-2 (10 ng/ml) gleicht derer der Positivkontrolle mit TGF- $\beta_1$  (1 ng/ml) (siehe Abb. 26).

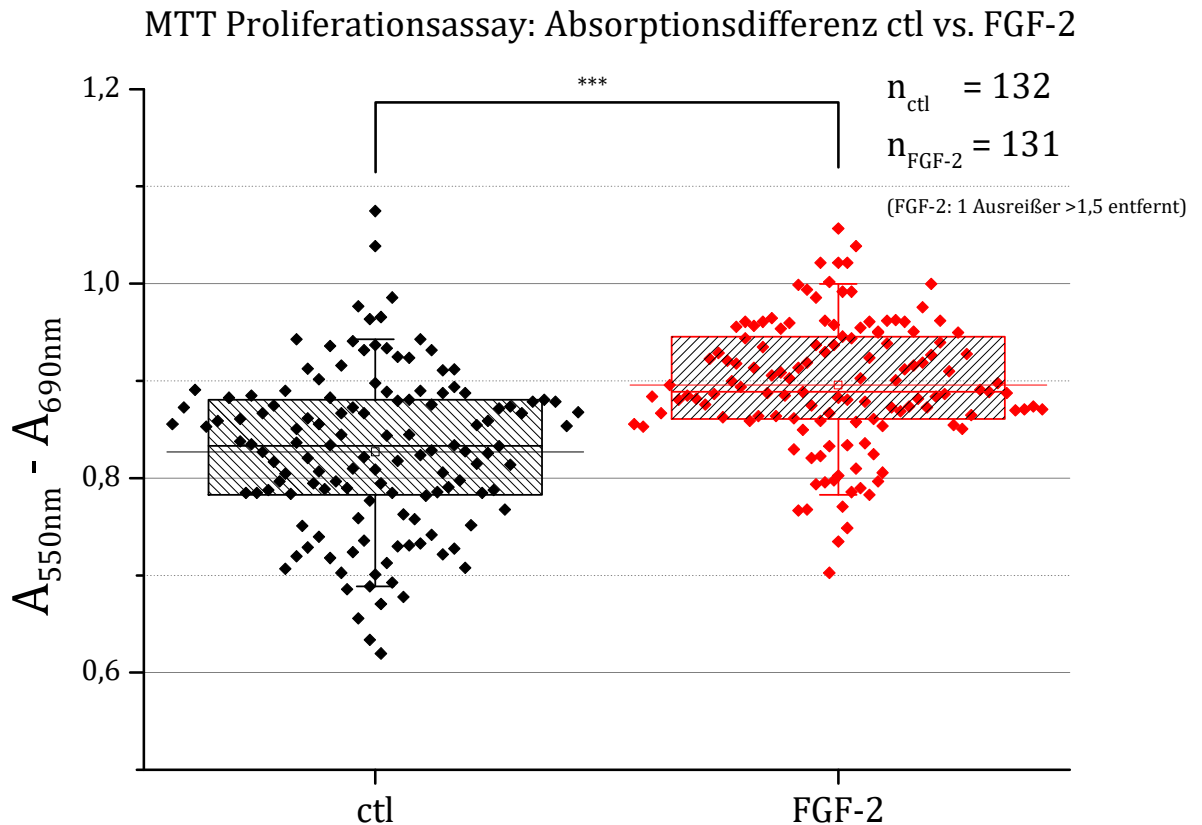
## Patch Clamp Messungen - Mittlerer KCNN4-spezifischer Strom ctl vs. TGFb vs. FGF2



**Abbildung 26:** Mittelwerte der auf die Kapazität normierten Summenströme durch KCNN4-Kanäle nach Stimulation mit FGF-2 (10ng/ml) oder TGF $\beta$ <sub>1</sub> (1ng/ml, Positivkontrolle) im Vergleich zur Kontrollgruppe. [Dargestellt ist der Mittelwert + SEM; \*\*: t-Test für Unterschied zur Kontrollgruppe:  $p < 0.005$ ]

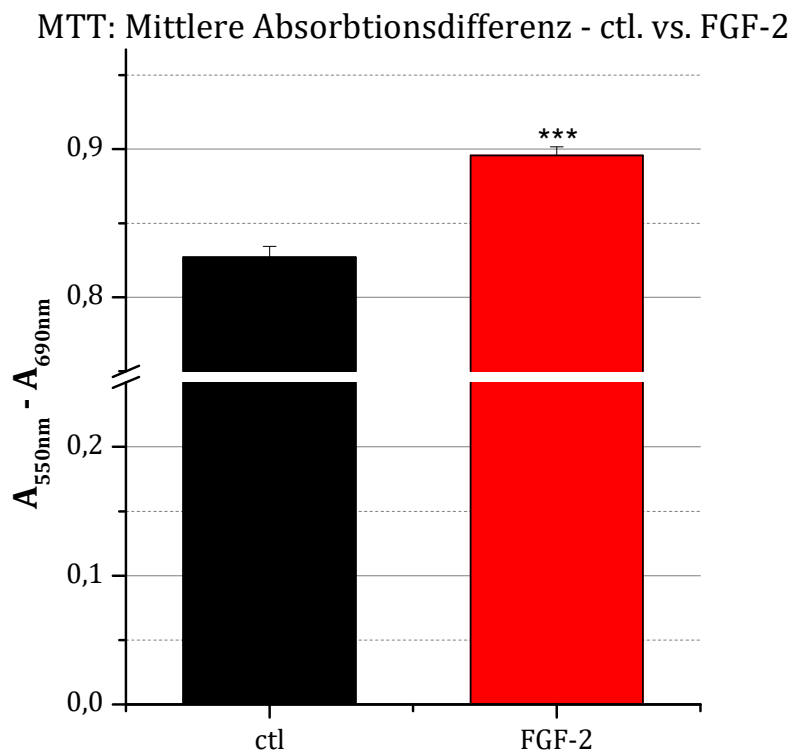
### 3.2 Proliferationsuntersuchungen

Die TFBs zeigten nach der mitogenen Stimulation mit FGF-2 in den Proliferationsexperimenten mit MTT eine signifikant höhere Absorptionsdifferenz, also mehr mittels NADPH verstoffwechseltes Formazan. Allerdings war der Unterschied mit ca. 10% kleiner als erwartet. Das Experiment wurde zweimal wiederholt, so dass insgesamt 132 Wells pro Experimentalgruppe in die Auswertung eingingen. Aus der FGF-2-Gruppe wurde ein Ausreißer ( $>1,5$ ) als Pipettierfehler angesehen und entfernt. Der t-Test vor Entfernen dieses Wertes erbrachte das gleiche Signifikanzniveau ( $p < 0.001$ ).



**Abbildung 27:** Absorptionsdifferenz im MTT-Proliferationsassay nach mitogener Stimulation. Stimulierte Zellen [FGF-2] erhielten 10ng FGF-2/ml, die Kontrollgruppe PBS [ctl]. Kumulative Darstellung der Messwerte aus drei Versuchen. Ein Ausreißer in der FGF-2-Gruppe mit >1,5 wurde als Pipettierfehler angesehen und entfernt. [Grenzen der Box: 25./75. Perzentile. Linie in der Box: Mittelwert. Quadrat: Median. Whisker: +/-1 SD.]

Abbildung 27 zeigt die Absorptionsdifferenz jeder einzelnen Messung im *Box-Whisker-Dot*-Diagramm. Das Ausmaß des Unterschiedes in der Proliferation ist kleiner, als durch die Expressionsmessungen des KCNN4 erwartet. Dennoch ist das Ergebnis hoch signifikant. Der Mittelwert der FGF-2 Gruppe liegt oberhalb der 75. Perzentile der Kontrollgruppe. Ein Ausreißer in der FGF-2-Gruppe mit >1,5 wurde als Pipettierfehler (Doublette) angesehen und entfernt.



**Abbildung 28:** Mittlere Absorptionsdifferenz nach Inkubation mit MTT. Stimulierte Zellen (FGF-2 10ng/ml) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dargestellt ist der Mittelwert + Standardfehler des Mittelwerts; Y-Achsen Skala unterbrochen bei 50% von 0,25-0,75. \*\*\*: ungepaarter, zweiseitiger t-Test für Unterschied zur Kontrollgruppe:  $p < 0.001$

Abbildung 28 zeigt die mittleren Absorptionsdifferenzen beider Gruppen vergleichend, Tabelle 12 die deskriptive Statistik.

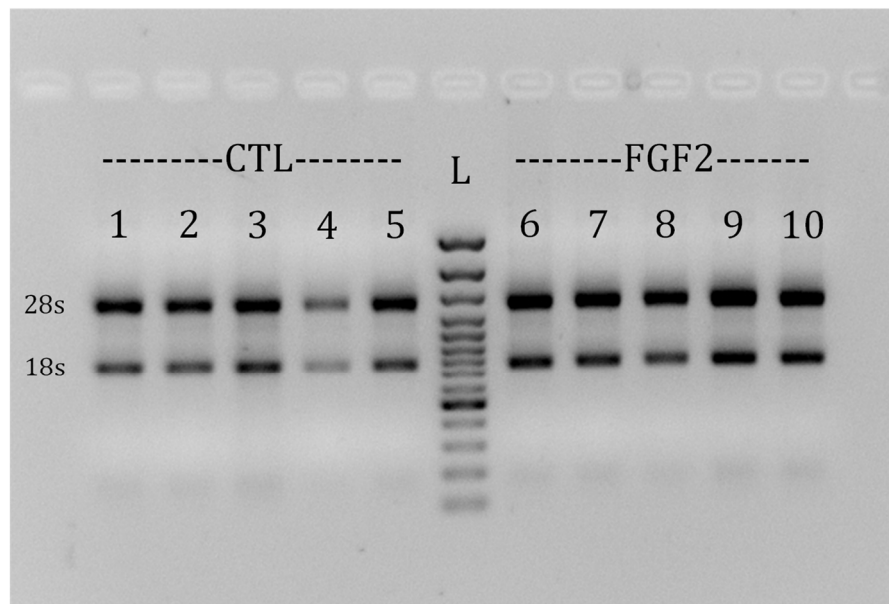
**Tabelle 14:** Ergebnisse des MTT-Proliferationsassays – Mittelwerte ( $A_{550nm} - A_{690nm}$ ) und SD: ctl vs. FGF-2

Gruppe:	n:	MW ( $A_{550nm} - A_{690nm}$ )	Standardabweichung:
ctl	132	0,89	0,082
FGF-2	131	0,96	0,066
Statistik:	Differenz der Mittelwerte	0,07	$p < 0,001$

### 3.3 Micro-RNA Expression

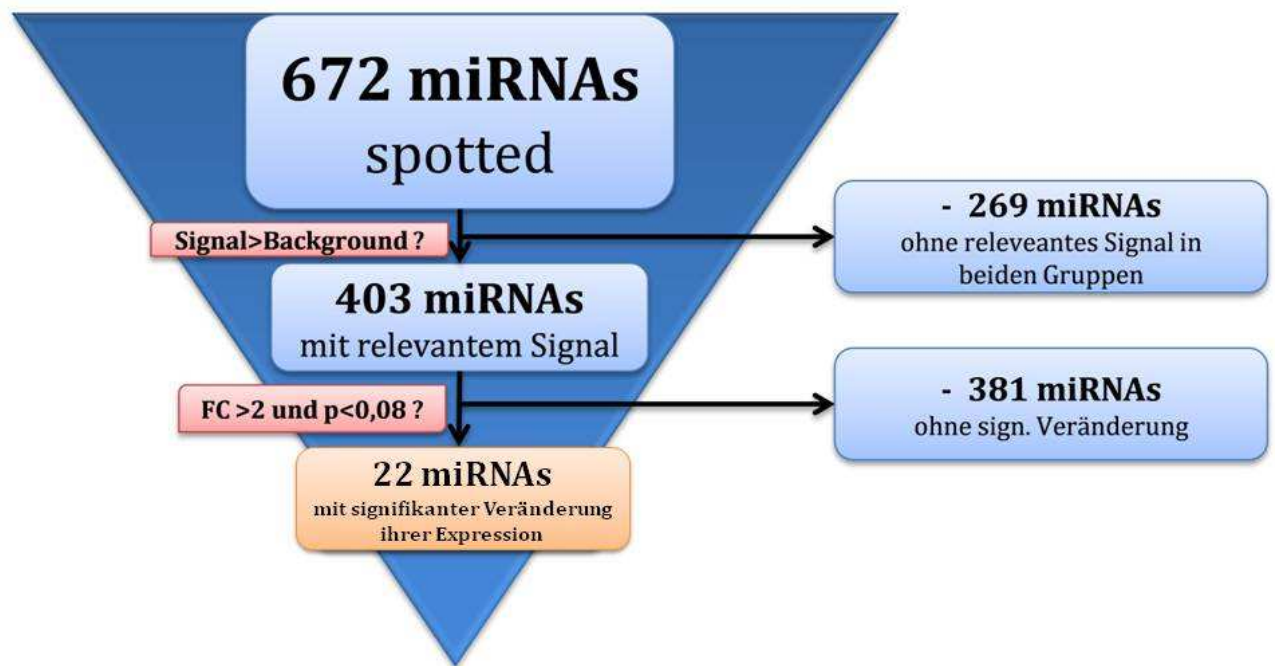
Der Versuchsablauf des Micro-RNA-Microarray Experiments entsprach dem unter 2.3.1. geschilderten in-vitro Fibrosemmodell: Ebenso wurden zwei Experimentalgruppen mit je vier biologischen Replikaten mit FGF-2 oder Vehikel nach dem oben beschriebenen Vorgehen behandelt. Die RNA-Isolation wurde anschließend in den Räumen der MicroArray Core Facility (Institut für Tumorbilogie, IMT) der Universität Marburg unter Anleitung von Dr. Krause durchgeführt, um einen unnötigen Transport der RNA zu vermeiden. In vergleichenden Vorabversuchen wurde das Trizol Reagenz als für diese Anwendung effektivste RNA-Isolationsmethode identifiziert und in den folgenden Versuchen eingesetzt. Trizol erzielte nicht nur eine höhere Konzentration der eluierten RNA, sondern auch eine höhere Qualität: Diese wurde in einem 1,5 % denaturierendem Agarosegel dokumentiert [siehe Abb. 29]. Hier zeigten alle zehn Proben eine gute RNA Qualität, erkennbar an den scharf abgrenzbaren Banden und dem 2:1 Verhältnis der eukaryontischen 28S und 18S RNA.

## RNA im denaturierenden Agarosegel



**Abbildung 29:** 1,5 % denaturierendes Agarosegel der für das miRNA-Microarray vorbereiteten RNA-Proben. Das 2:1 Verhältnis der Intensität der 28s zur 18s Bande zeigt die gute Qualität der isolierten RNA.

Da der Arraychip Kapazität für acht Proben bot, wurde – wie im Voraus geplant - je Gruppe die Probe mit der niedrigsten RNA-Konzentration (Proben 4 und 8) vom Array ausgeschlossen.

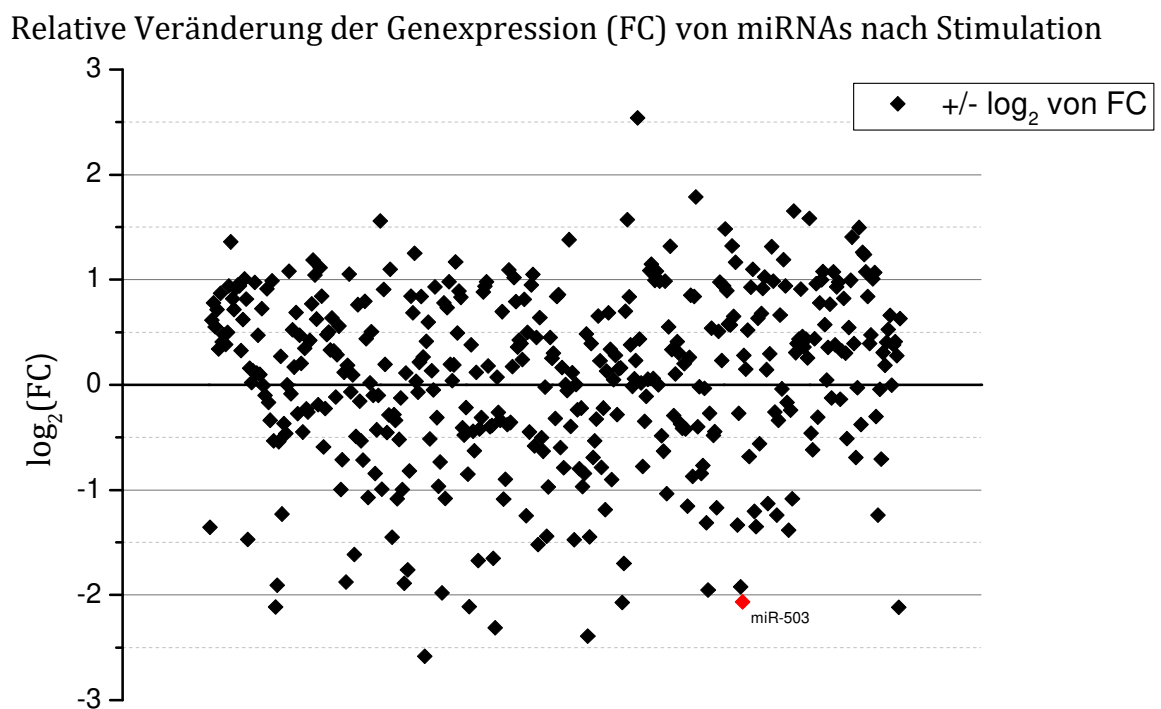


**Abbildung 30:** Ergebnisbaum des microRNA Microarrays.

Somit wurde die RNA von je vier biologischen Replikaten der FGF-2 und der Kontrollgruppe auf das Microarray gespottet. Der Chip enthielt 672 miRNA-Sequenzen gemäß der zum Zeitpunkt des Arrays gültigen miRBase (v15.0) (Kozomara and Griffiths-Jones, 2011). Von diesen 672 miRNAs zeigten in der anschließenden Analyse 269 kein über den Hintergrund hinausgehendes Signal in beiden Gruppen, daher kann für diese miRNAs keine zuverlässige Aussage bezüglich ihrer Expression getroffen werden - sie wurden von weitergehenden Analysen ausgeschlossen. Von den verbleibenden 403 miRNAs wurden in einem zweiten Schritt alle microRNAs ausgeschlossen, die entweder keine Expressionsveränderung um mindestens den Faktor zwei ( $FC > 2$ ) zwischen den beiden Experimentalgruppen (FGF-2 vs. CTL) aufwiesen oder bei denen aufgrund



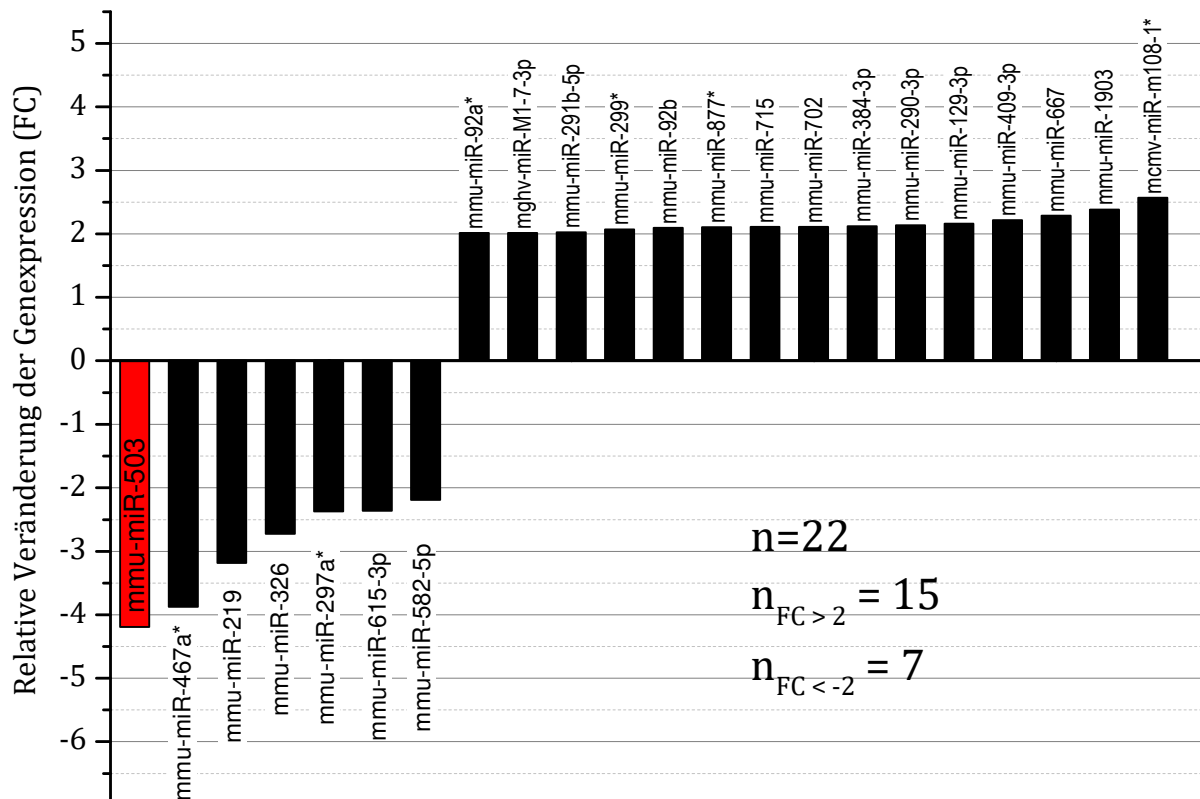
einer größeren Streuung der Messwerte der einzelnen Spots die Aussage über die Expressionsveränderung nicht mit einer hinreichenden Sicherheit möglich war. ( $p < 0,08$ ). So verblieben 22 miRNAs, bei denen mit hinreichender Sicherheit eine signifikante Veränderung ihrer Expression (eng: *differentially regulated miRNAs*) nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 31:** Darstellung des log zur Basis 2 der relativen Veränderung der Genexpression (FC, *foldchange*) der 403 detektierten miRNAs von Kontrollgruppe zur FGF-2-Gruppe in der miRNA-Microarrayuntersuchung. Hervorgehoben in Rot: miR-503.

In Abbildung 31 sind die Expressionsveränderungen aller miRNAs von der Kontrollgruppe zur FGF-2 Gruppe gezeigt. Veränderung über den Faktor vier hinaus ( $\log_2(4)=2$ ) sind insgesamt selten. Der Großteil der untersuchten miRNAs wird durch die Stimulation mit FGF-2 in ihrer Expression nur unwesentlich verändert. Rot hervorgehoben ist die stärkste der signifikant-expressionsveränderten miRNAs, die miR-503.

## Signifikante Expressionsveränderung der miRNAs [FC>2, p<0,08]



**Abbildung 32:** Darstellung der als signifikant expressionsverändert angesehenen miRNAs. Säulendarstellung der relativen Veränderung der Expression der miRNA in der FGF-2-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. n=22, davon zeigen sieben eine Herunterregulation nach Zugabe von FGF-2 ( $FC < -2$ ) und 15 eine Heraufregulation ( $FC > 2$ ). Rot markiert: miR-503. Ein Stern (\*) hinter dem Namen einer miRNA steht für das Transkript vom entgegengesetzten Arm eines Precursors, welches weniger häufig cloniert wurde als das Primärtranskript (das ohne Stern notiert wird).

Abbildung 32 zeigt die 22 signifikant expressionsveränderten miRNAs. Sieben von Ihnen (auch die rot markierte miR-503 als die mit der größten Expressionsveränderung) erscheinen in der FGF-2-stimulierten Gruppe herunterreguliert. 15 werden gegenüber der Kontrollgruppe heraufreguliert.

**Tabelle 15:** Signifikant expressionsveränderte miRNAs (FC>2 und p<0,08)

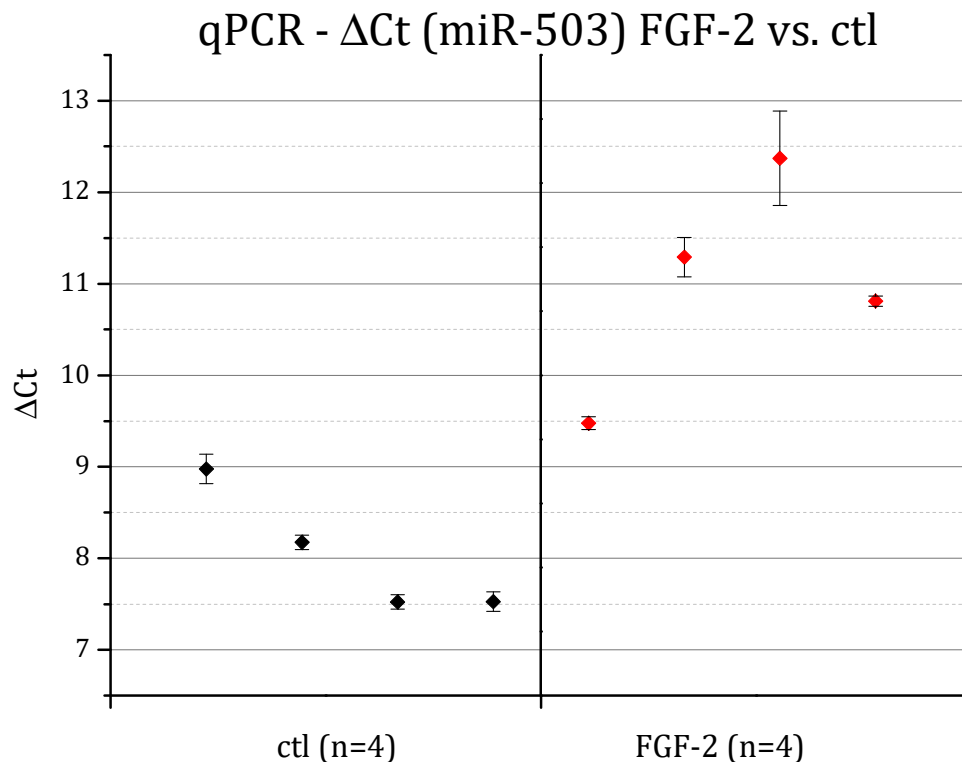
Name	p-Wert	FC	Regulationstyp
<b>mmu-miR-503</b>	0.034	<b>-4.1896</b>	down
<b>mmu-miR-467a*</b>	0.031	<b>-3.8762</b>	down
<b>mmu-miR-219</b>	0.013	<b>-3.1864</b>	down
<b>mmu-miR-326</b>	0.005	<b>-2.7268</b>	down
<b>mcmv-miR-m108-1*</b>	0.029	<b>2.5675</b>	up
<b>mmu-miR-1903</b>	0.006	<b>2.3818</b>	up
<b>mmu-miR-297a*</b>	0.011	<b>-2.3725</b>	down
<b>mmu-miR-615-3p</b>	0.034	<b>-2.3648</b>	down
<b>mmu-miR-667</b>	0.007	<b>2.2835</b>	up
<b>mmu-miR-409-3p</b>	0.025	<b>2.2152</b>	up
<b>mmu-miR-582-5p</b>	0.005	<b>-2.1920</b>	down
<b>mmu-miR-129-3p</b>	0.020	<b>2.1635</b>	up
<b>mmu-miR-290-3p</b>	0.012	<b>2.1332</b>	up
<b>mmu-miR-384-3p</b>	0.003	<b>2.1202</b>	up
<b>mmu-miR-702</b>	0.013	<b>2.1114</b>	up
<b>mmu-miR-715</b>	0.028	<b>2.1079</b>	up
<b>mmu-miR-877*</b>	0.014	<b>2.1062</b>	up
<b>mmu-miR-92b</b>	0.021	<b>2.0958</b>	up
<b>mmu-miR-299*</b>	0.014	<b>2.0694</b>	up
<b>mmu-miR-291b-5p</b>	0.023	<b>2.0252</b>	up
<b>mghv-miR-M1-7-3p</b>	0.033	<b>2.0134</b>	up
<b>mmu-miR-92a*</b>	0.027	<b>2.0133</b>	up

Anschließend wurde diese Gruppe aus 22 miRNAs mit zwei weitverbreiteten bioinformatischen Programmen zur Bindungsstellenanalyse (eng. *target prediction tools*) *Pictar* (Krek *et al.*, 2005) und *TargetScan* (Lewis, Burge and Bartel, 2005) daraufhin untersucht, ob die 3'UTR Region des KCNN4 eine Bindungsstelle für sie aufweist. Dies war bei keiner der 22 miRNAs der Fall.

Daraufhin wurde mit den genannten Programmen gezielt nach Genen gesucht, welche eine Bindungsstelle für eine der 22 expressionsveränderten miRNAs aufweisen. Hier fanden sich bei der Untersuchung der Bindungsstellen der miR-503 - der miRNA mit der stärksten Expressionsveränderung - mit RAF1 (ein Upstreamregulator des KCNN4) und FGF-2 zwei interessante potentielle Zielgene.

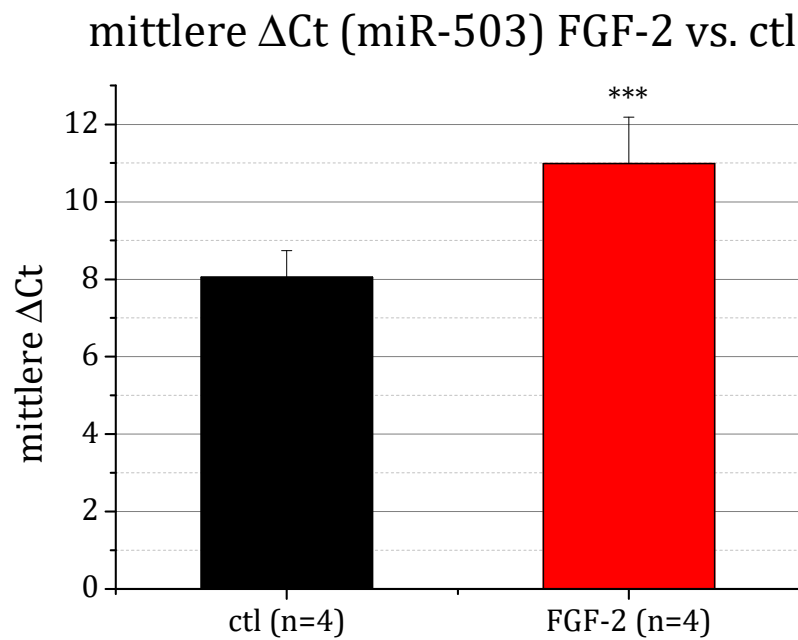
Der durch das Screeningarray aufgeworfene Verdacht einer signifikanten Herunterregulation der miR-503 nach mitogener FGF-2-Stimulation wurde anschließend in quantitativen real-time-PCR-Untersuchungen validiert. Für miR-

129-3p wurde ebenfalls eine Validierung mit miRNA-spezifische PCR versucht, allerdings ließen sich für dieses Ziel keine ausreichend spezifischen und effektiven stem-loop Primer etablieren, so dass sich die Darstellung im Folgenden auf miR-503 beschränkt.



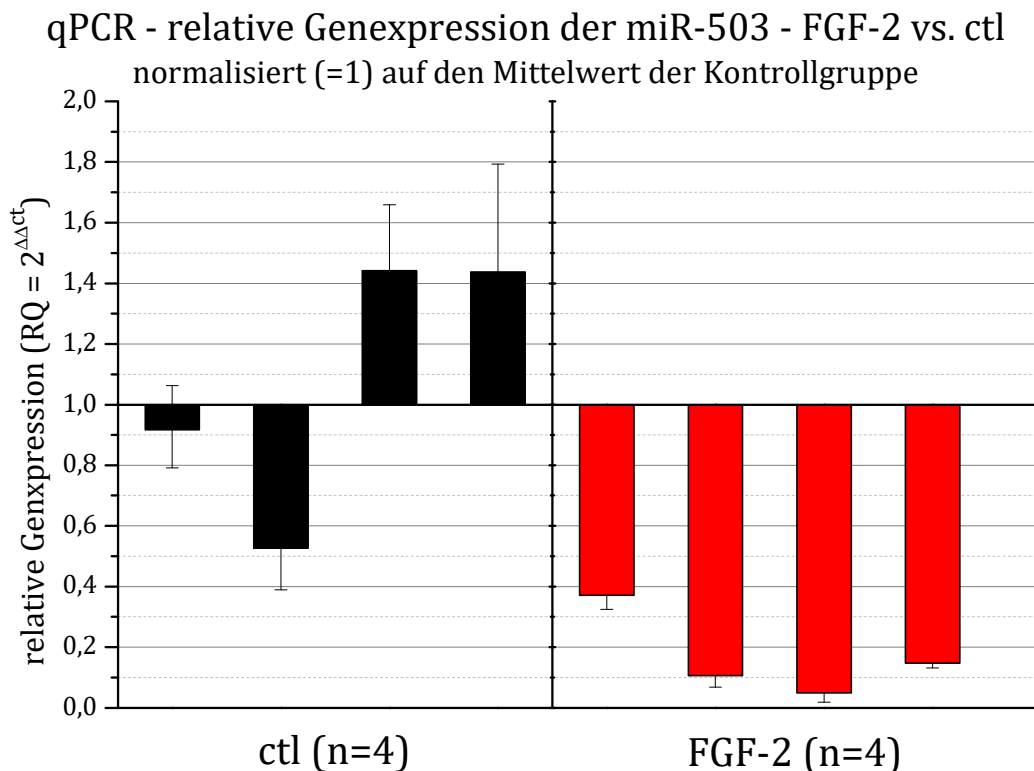
**Abbildung 33:** Darstellung der  $\Delta C_t$  der miR-503 zur endogenen Kontrolle snoRNA202 nach reverser Transkription und quantitativer, micro-RNA spezifischer real-time PCR. Vergleich von Kontrollgruppe und FGF-2-Gruppe: vier Proben je Gruppe (biologische Replika) Darstellung als  $\Delta C_t$  +/- SE (RQmin/Max) aus dem vierfachen PCR-Ansatz pro Probe.

Die quantitative, miRNA-spezifische real-time PCR bestätigt die Vermutung der Herunterregulation der miR-503 nach FGF-2 Stimulation: In Abbildung 33 zeigen die vier biologischen Replikate der FGF-2 Gruppe eine deutlich höhere  $\Delta C_t$  im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe. Methodentypisch nimmt der Standardfehler der 4 technischen Replikate mit abnehmender Expression der miRNA (= zunehmender  $\Delta C_t$ ) und späterer Detektion zu.



**Abbildung 34:** Darstellung der mittleren  $\Delta C_t$  der miR-503 zur endogenen Kontrolle snoRNA202 nach reverser Transkription mit spezifischen Primern und quantitativer micro-RNA-spezifischer real-time PCR als Vergleich zwischen Kontrollgruppe und FGF-2-Gruppe. Whisker: + SD einer Gruppe. Signifikanztestung: zweiseitiger, zweiseitiger t-Test für Unterschied zur Kontrollgruppe:  $p < 0,01$ .

Betrachtet man die Mittelwerte beider Gruppen (siehe Abb. 34) mit den als Fehlerindikator aufgetragenen Standardabweichungen (SD), erkennt man einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ).



**Abbildung 35:** Relative Expression der miR-503 nach quantitativer real-time PCR. Dargestellt ist die Veränderung der Genexpression (RQ). Werte normalisiert auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (=1). Whisker: RQmin/max des vierfachen PCR-Ansatzes einer Probe. Mittlere Genexpression der Kontrollgruppe: 1,18 +/- 0,48 (SD).. Mittlere Genexpression in der FGF-2-Gruppe: 0,18 +/- 0,15 (SD). Je vier biologische Replikate pro Experimentalgruppe. Lesebeispiel: In der ersten Probe der FGF-2-Gruppe fanden sich ca. 40% der miR-503-Dosis im Vergleich zu Kontrollgruppe.

Übersetzt man dies in die mittlere, relative Genexpression der miR-503, liegt diese in der FGF-2 Gruppe bei 13% im Vergleich zur Kontrollgruppe (=1) (siehe Abb. 35). Die Korrelation der biologischen Replika ist gut: Jede Probe der FGF-2-Gruppe liegt unter dem niedrigsten Wert der Kontrollgruppe. Die Genexpression der miR-503 wird durch FGF-2-Stimulation um den Faktor 7,7 herunterreguliert.

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Expression des Ionenkanals KCNN4 nach fibrogenem Reiz im in-vitro Fibrosemmodell

Die oben beschriebenen Untersuchungen konnten zeigen, dass durch das eingesetzte in-vitro Fibrosemmodell nach der mitogenen Stimulation mit FGF-2 oder TGF- $\beta$  die Expression des KCNN4-Kanals in murinen Nierengewebsfibroblasten signifikant gesteigert ist. Diese Heraufregulation zeigte sich einerseits als erhöhte Transkription des KCNN4-Gens in der qPCR: Die Menge der KCNN4- mRNA ist nach Stimulation mit FGF-2 um den Faktor 2,25 heraufreguliert.

	<b>RQmean</b>	<b>SEM</b>
	KCNN4-Genexpression (normalisiert)	Standardfehler des Mittelwerts
Kontrollgruppe (n=16)	1	0,15
FGF-2-Gruppe (n=15)	2,25	0,28
<b>Regulationsfaktor (FGF-2/ctl)</b>	<b>+ 2,25</b>	
<b>Signifikanz (t-Test)</b>	<b>p&lt;0,001</b>	

**Tabelle 16:** Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der qPCR (KCNN4) (vgl. Abbildung 22)

Zusätzlich konnten die funktionellen Untersuchungen des Kanals mittels Patch Clamp eine vermehrte Membranleitfähigkeit durch KCNN4-Kanäle nachweisen:

Der spezifische, auf die Größe der Zelle (Membrankapazität) normierte Strom durch KCNN4-Kanäle nahm nach der Stimulation mit FGF-2 um den Faktor 1,91 zu.

	<b>Mittlerer KCNN4- spezifischer Strom</b> I/C in pA/pF	<b>SEM</b>  Standardfehler des Mittelwerts
Kontrollgruppe (n=8)	15,61	2,59
FGF-2-Gruppe (n=9)	29,83	3,04
<b>Regulationsfaktor (FGF-2/ctl)</b>	<b>+1,91</b>	
<b>Signifikanz (t-Test)</b>	<b>p&lt;0,005</b>	

**Tabelle 17:** Patch-Clamp Messungen der KCNN4-spezifischen Ströme als mittlerer, auf die Membrankapazität normierter Strom (vgl. Abbildung 23).

Die gute Korrelation von qPCR und Patch-Clamp mit einer Heraufregulation des Kanals um ca. den Faktor 2 bestärken die Hypothese, dass durch die Stimulation mit FGF-2 nicht nur vermehrte mRNAs des KCNN4-Gens transkribiert werden, sondern diese mRNAs auch in nahezu gleichem Ausmaß in funktionstüchtige Kanalproteine translatiert und in die Zellmembran transloziert werden. Diese Ergebnisse bestätigen bereits veröffentlichte und unveröffentlichte Daten unserer und anderer Arbeitsgruppen an Fibroblasten (Peña and Rane, 1999; Grgic *et al.*, 2009). Eine Heraufregulation des Kanals nach mitogener Stimulation konnte außerdem an anderen Zellarten und in anderen Spezies gezeigt werden, beispielsweise in der Ratte an Gefäßmuskelzellen (Si *et al.*, 2006) und Herzfibroblasten (Wang *et al.*, 2013) oder an humanen Endothelzellen (Grgic *et al.*, 2005). Daher ist davon auszugehen, dass die beschriebenen Effekte nicht auf die eingesetzte murine Nierenfibroblastenzelllinie beschränkt sind. Das Ausmaß der Heraufregulation ist außerdem unabhängig vom Stimulus, die Ergebnisse sind nach Zugabe von FGF-2 vergleichbar mit denen nach Zugabe von TGF- $\beta$  (vgl. Abbildung 26). Dies entspricht der von Strutz und Kollegen beschriebenen Hypothese, dass der Effekt der TGF- $\beta$  induzierten Heraufregulation des KCNN4 über auto- und



parakrine FGF-2 Freisetzung vermittelt wird (Strutz *et al.*, 2001). Die Expression des Kanals ist darüber hinaus in vielen anderen Zellen nachgewiesen worden.

## **4.2 Proliferation der Fibroblasten nach mitogener Stimulation**

Die vermehrte Proliferation der TFBs nach Stimulation war bereits in vorangegangenen Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe durch Assays, die eine vermehrte DNA-Synthese nachweisen (BRDU), gezeigt worden (Grgic *et al.*, 2009). Daher wurde in diesem Projekt mit MTT ein stoffwechselbasiertes Assay mit einem anderen Mechanismus zur Messung von Proliferation eingesetzt. Das Ausmaß der Zunahme der Proliferation nach Stimulation lässt sich aufgrund der unterschiedlichen Messgrößen- und Messmechanismen der Assays nicht direkt vergleichen: Das MTT-Assay misst die Absorptionsdifferenz nach der NADPH-abhängigen Umsetzung eines Formazansalzes, also das Ausmaß einer Stoffwechselleistung vitaler Zellen. BRDU (5-Bromo-2'-deoxy-uridin) wird hingegen an Stelle von Thymidin in die DNA eingebaut, es quantifiziert somit die DNA-Syntheseleistung der Zellen. Mit den gezeigten Untersuchungen konnte nun nachgewiesen werden, dass zusätzlich zur vermehrten DNA-Synthese auch eine erhöhte Stoffwechselleistung der stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe vorliegt: Die Absorptionsdifferenz der beiden Gruppen unterschied sich hochsignifikant ( $p < 0,001$ ), wenngleich die Ausprägung dieses Unterschiedes kleiner war als durch die vorangegangenen BRDU-Experimente erwartet. Die Vermutung, dass durch die Stimulation im vorliegenden Modell die Stoffwechselleistung über das Maß der DNA-Synthese hinaus gesteigert werde, z.B. als metabolische Aktivierung sich nicht-teilender Zellen, lässt sich durch diese Ergebnisse nicht bestätigen. Der fibrotische Stimulus in diesem Modell scheint vielmehr Proliferation (Zellteilung mit gesteigerter DNA-Synthese) als eine metabolische Aktivierung (vermehrter Stoffwechselleistung auf Einzelzellebene) zu verursachen. Für zukünftige Untersuchungen mit diesem in-vitro Fibrosemmodell scheint sich das Ausmaß der Proliferation mit DNA-Synthese-basierten Verfahren wie BRDU besser quantifizieren zu lassen als mit stoffwechselbasierten. Denkbar, aber aufgrund der fehlenden Stoffwechselaktivierung unwahrscheinlich, ist die Variante, dass bei der Quantifizierung der DNA-Synthese das Ausmaß der proliferierenden Zellen überschätzt. Dies wäre durch Zellen, die zwar in die G2-

Phase eintreten und DNA synthetisieren, sich dann aber nicht teilen, erklärbar. Dass die Proliferation von Fibroblasten mit vermehrter Fibrose assoziiert ist, zeigen auch klinische Daten zur Nierenfibrose: Das Ausmaß der Expression von  $\alpha$ -SMA in Nierenbiopsien – ein Surrogatparameter für die Anzahl matrixproduzierender Fibroblasten – ist mit einer schlechten Prognose der Nierenfunktion beispielsweise bei Patienten mit Lupusnephritis oder IgA- Glomerulonephritis assoziiert (Hewitson and Becker, 1995; Makni *et al.*, 2009).

### 4.3 MircoRNA Expressionsuntersuchungen

Von allen untersuchten miRNAs bietet die miR-503 mit einer Reduktion ihrer Expression auf ca. 20% nach FGF-2 Stimulation die stärkste Expressionsänderung. Diese Herabregulation ließ sich durch eine micro-RNA-spezifische real-time-qPCR an vier biologischen Replika bestätigen. Die miR-503 gehört zur erweiterten miR-15/16 Familie, mit deren Mitgliedern sie sieben von acht Basen ihrer Seedregion teilt (Rissland, Hong and Bartel, 2011). Innerhalb dieser Familie bildet miR-503 einen Cluster mit miR-424, deren Genlokus auf dem Chromosom X bei q26.3 nur 383 Basenpaare vom Lokus der miR-503 entfernt liegt. Über die biologische Funktion dieser miR-Familie allgemein und der miR-503 im Speziellen ist wenig bekannt: Nach den wenigen veröffentlichten Untersuchungen wird miR-503 in malignen wie nicht-malignen Modellen mit Zellzyklusregulation, Differenzierung und Zellproliferation in Verbindung gebracht. Ihre Funktion bei Fibrose ist bis auf eine Untersuchung, die Ihre Assoziation zur Sklerodermie zeigt (Zhu *et al.*, 2012), nicht untersucht. Zu Ihrer Rolle bei Nierenerkrankungen oder speziell der Nierenfibrose liegen bis zum heutigen Tage keine Daten vor. Die veröffentlichten Erkenntnisse zu dieser miRNA kommen aus anderen Modellsystemen:

2009 untersuchten Forrest und Kollegen eine AML-M5-Zelllinie, die sie durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zur Differenzierung brachten. Nach der Zugabe von PMA waren vier miRNAs – unter anderem miR-503 und miR-424 – deutlich heraufreguliert. Nach selektiver Überexpression dieser miRNAs durch Transfektion sahen sie eine Differenzierung sowie einen G1-Arrest der Leukämiezellen. Sie zeigten weiterhin, dass diese Effekte über mehrere Zellzyklusregulatoren wie die Cycline E1, D1 und D3 (CCNE1, CCND1, CCND3), die

Cyclinabhängige Kinase 6 (CDK6) und den cyclinabhängigen Kinase Inhibitor 1A (CDKN1A, p21) vermittelt werden. Sie zeigten auch, dass mir-503 und mir-424 von einem gemeinsamen, polycistronischen Vorläufer abstammen (Forrest *et al.*, 2009). Forrest merkt an, dass dieses Arrangement mehrerer polycistronischer miRNAs gleicher Seedregion mit einem gemeinsamen Precursor bereits bei anderen miR-Familien beschrieben ist. Beispielsweise induzieren miR-15a und miR-16-1 gemeinsam Apoptose durch BCL2-Inhibition (Cimmino *et al.*, 2005). Möglicherweise ist die topische Konzentration kooperierender miRNAs im Genom ein weit verbreitetes biologisches Konzept der Architektur des *miRNoms*.

Neben Forrests Untersuchungen an Leukämiezellen deuten auch andere Arbeiten auf eine Zellzyklusregulation durch miR-503 hin: Sarkar und Kollegen untersuchten die Muskelzellentwicklung durch Differenzierung der Myoblastenzelllinie C2C12 zu Myotuben, den Vorläufern von Muskelzellen. Dieser Schritt gelingt durch Serumentzug und induziert durch Hypophosphorylierung des Retinoblastom Proteins (Rb) über eine inhibitorische Phosphorylierung der cyclinabhängigen Kinase 2 (CDK2) einen Zellzyklusarrest in G0/G1. Dies geschieht durch die Herunterregulation von CDC25A - der Phosphatase, die die inhibitorische Phosphorylierung von CDK2 entfernt. Sarkar *et al.* zeigten, dass miR-503 (gemeinsam mit den „Familienmitgliedern“ miR-322/424) durch die Hemmung von CDC25A für das Verbleiben der inhibitorischen Phosphorylierung von CDK2 und damit für den Zellzyklusarrest und die Differenzierung verantwortlich ist (Sarkar, Dey and Dutta, 2010). Die miR-503 könnte somit eine wichtige Funktion in der Regulation des Zellzyklus einnehmen. Ihre Regulation ist nicht nur ein Paraphänomen von Proliferation, sondern Ihre Überexpression führt selbst zur Differenzierung.

Auch der calciumabhängige Kaliumkanal KCNN4 erfüllt eine wichtige Funktion in der Zellproliferation: Er wird bei der Proliferation verschiedenster Zelltypen verstärkt exprimiert, was unter anderem in Gefäßmuskelzellen (Si *et al.*, 2006) durch den Transkriptionsfaktor REST (Cheong *et al.*, 2005) oder in Fibroblasten (Wang *et al.*, 2013) gezeigt wurde. Eine essentielle Funktion des Kanals ist die Bereitstellung einer Kaliumleitfähigkeit zur Aufrechterhaltung der negativen Hyperpolarisation bei Calciumeinstrom. Dies ist eine notwendige Bedingung für Proliferation. Die selektive pharmakologische Blockade oder der genetischen

Knock-Out des Kanals hemmt die Proliferation von Epithelzellen und Fibroblasten, die Angiogenese und die Entwicklung einer Nierenfibrose im Mausmodell (Grgic *et al.*, 2005, 2009). Peña und Kollegen zeigten, dass die Regulation des Kanals von der Aktivität der Ras/RAF/MEK/ERK Kaskade abhängt (Peña *et al.*, 2000).

Eine direkte Regulation des Ionenkanals KCNN4 durch die Bindung einer microRNA in der 3'UTR des KCNN4-Gens konnten zwar nicht gezeigt werden, allerdings wurde mit RAF1 als Mitglied dieser Kaskade ein Up-Stream-Regulator identifiziert: Das RAF1-Gen weist in seiner 3'UTR an Pos 108-114 eine Sequenz auf, die eine potentielle Bindungsstelle für die miR-503 darstellt. Dieser Locus wurde nun daraufhin untersucht, ob an der beschriebenen Bindungsstelle tatsächlich eine Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA stattfindet und eine biologisch relevante Expressionsänderung resultiert oder ob diese der Bindungsstelle entsprechende Basenfolge nur zufällig der Zielsequenz der miRNA ähnelt und als „falsch-positive“ Vorhersage zu bewerten ist.

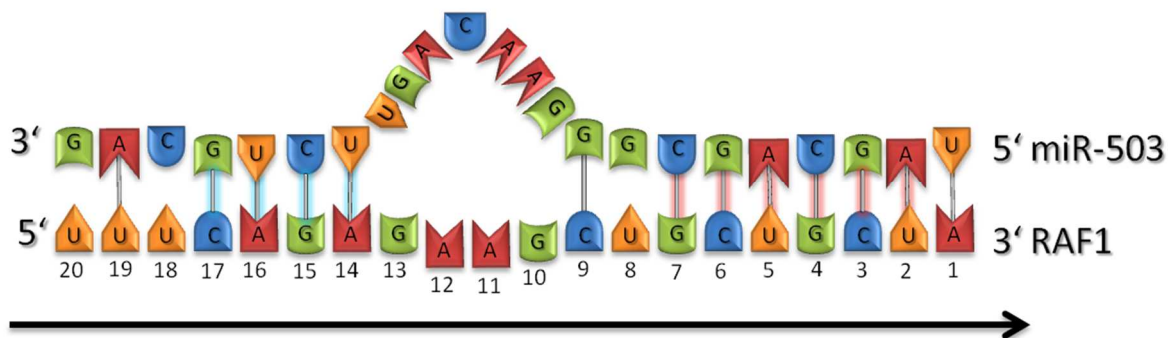
Hierzu kann die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um eine „echte“, biologisch aktive Bindungsstelle handelt mithilfe komplexer Algorithmen vorhergesagt werden. Diese Algorithmen haben sich seit der Entwicklung von *TargetScan* über die einfache Basenpaarung hinaus entwickelt und berücksichtigen nun nach mehreren Modifikationen zahlreiche weitere Faktoren: Diese Entwicklung begann 2003, als Lewis *et al.* an ca. 400 Zielgenen zeigten, dass für die effektive Regulation eines Zielgens vor allem eine Bindung an den Basen 2-8 (vom 5'-Ende aus) der miRNA erforderlich ist (sog. *seed-pairing*; (Lewis *et al.*, 2003). Von 15 näher untersuchten miRNAs konnten elf als biologisch aktiv bestätigt werden, was einer falsch-positiven Rate von 31% der vorhergesagten Bindungsstellen entspricht. Zwei Jahre später – nach der Verfügbarkeit der Sequenzdaten der untranslatierten Regionen der Genome von Hund und Huhn - veröffentlichte die gleiche Arbeitsgruppe eine Fortsetzung dieser Arbeit, in der durch Hinzunahme der *Konservierung* (in Mensch, Maus, Ratte, Hund und Huhn) als Kriterium in den Algorithmus eine Verbesserung des Signal-zu-Hintergrund Verhältnisses (*signal-to-noise ratio*) auf 3,5 : 1 erreicht wurde (sog. *conserved seed pairing*; (Lewis, Burge and Bartel, 2005).

**Tabelle 18:** Grundprinzipien der Bindungsstellenvorhersage mit *Target Scan*

Literatur	Prinzip	Vorliegende Bindungsstelle (Pos. 108-114 der RAF1 UTR)
(Lewis <i>et al.</i> , 2003)	<i>Seed pairing</i>	✓
(Lewis, Burge and Bartel, 2005)	<i>Conserved seed pairing</i>	✓
(Grimson <i>et al.</i> , 2007)	<i>Site context</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• weitere miRNA-Bindungsstellen</li> <li>• Länger als 15nt vom Stoppcodon entfernt</li> <li>• Nicht in der Mitte langer UTRs</li> <li>• AU-Anreicherung</li> <li>• Zusätzliche Basenpaarung an Pos. 12-17</li> </ul>	✓ ✓ ✓ ✗ (✗)
Garcia 2011	<i>target-site abundance</i> (TA)  <i>seed-pairing stability</i> (SPS)	✓  ✓

Gleichzeitig konnten sie zeigen, dass auch bei nur sieben der acht passenden Basen in der Seedregion mit hoher Wahrscheinlichkeit eine aktive Bindungsstelle vorliegt, wenn entweder der Seed von einem Adenosin in Position 1 flankiert wird, oder direkt vor der Bindungsstelle an Position 8 eine konservierte Basenpaarung stattfindet (*t1A* oder *m8M*). Die komplette Analyse der untranslatierten Regionen des menschlichen Genoms mit allen damals bekannten miRNAs erbrachte in dieser Untersuchung ca. 14.300 Bindungsstellen für miRNAs in den UTRs von 5.300 Genen. Die Kontrollgruppe mit zufällig ausgewählten Hexameren zeigte nur 5.800 Treffer (=falsch-positive), so dass die Differenz von 8.400 Bindungsstellen in 2.800 Genen als Regulationsziele von miRNAs angesehen wurden. Dies macht nach aktuellen Schätzungen ca. 22% aller proteinkodierenden Gene aus. Der hieraus entwickelte bioinformatische Vorhersagealgorithmus (*TargetScanS*) wurde 2007 von Grimson und Kollegen durch mehrere Faktoren ergänzt, die über die

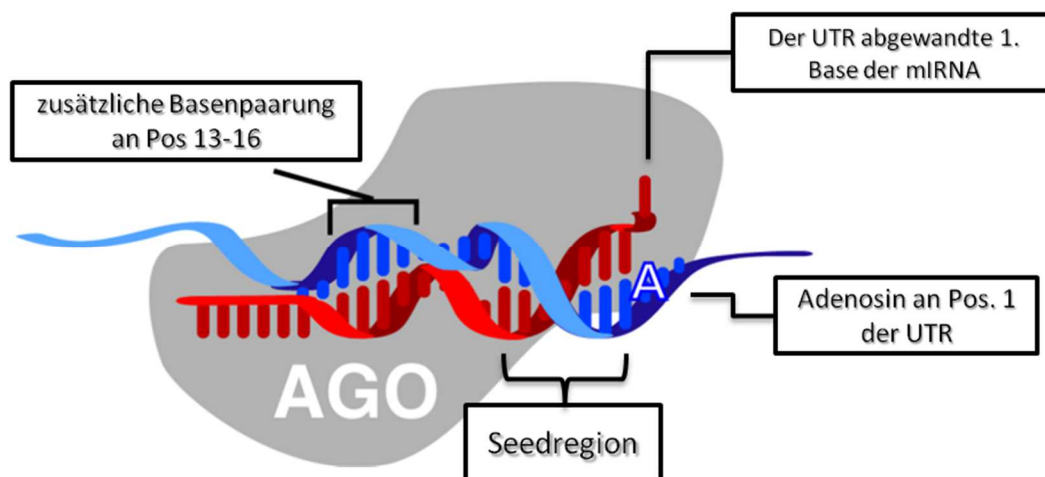
konservierte Basenpaarung in der Seedregion hinausgehen und den sog. *Kontext* der Bindungsstelle in der Vorhersage mit einbeziehen ((Grimson *et al.*, 2007).



**Abbildung 36:** Bindungsstelle der miR-503 an der 3'UTR des RAF1-Gens: Gezeigt ist die komplette miR-503 sowie die 3'UTR des RAF1 Gens an nt 95 5'-seitig. Die Bindung erfolgt in der Seedregion (rötliche Verbindungsbalken) mit einem sog. *7mer-1A* (Basenpaarung an Positionen 2-7 + ein Adenosin UTR-seitig an Position 1). Die Bindung U-A in Position 1 ist hypothetisch, da die vermutete Sekundärstruktur der miRNA im Argonautenprotein keine Bindung an den Zielstrang in Pos. 1 zulässt. Zusätzlich liegen weitere 4 Basenpaarungen 3'-seitig an den Positionen 14-17 (bläuliche Balken) und eine weitere an Pos. 19 vor (sog. *3'-supplementary pairing*). (Sequenz: microRNA.org. Darstellung: C. Mann)

Sie fanden fünf Eigenschaften einer Bindungsstelle, die ihre Wahrscheinlichkeit, biologisch aktiv zu sein, deutlich erhöhten (siehe Tab. 18): Zunächst ist dies die Nähe zu einer Bindungsstelle einer anderen miRNA der gleichen Familie, die wahrscheinlich eine kooperierende Wirkung mehrerer miRNAs bei der Suppression eines Ziel zulässt. Außerdem ist die Position der Bindungsstelle in der untranslatierten Region (nicht in der Mitte langer UTRs und mindestens 15nt vom Stoppcodon entfernt) wichtig für die Effektivität einer Bindungsstelle. Insbesondere der Abstand zum Stoppcodon erscheint aus mechanistischen Gesichtspunkten verständlich: Wäre der Seed näher am Stoppcodon, wäre die Integrität des an die mRNA gebundenen Regulationskomplexes (bestehend u.a. aus dem Argonautenprotein und der darin ‚geladenen‘ miRNA) durch den herannahende ribosomalen Translationskomplex gefährdet (Bartel, 2009). Des Weiteren ist eine vorhergesagte Bindungsstelle mit höherer Wahrscheinlichkeit biologisch aktiv, wenn die Basen in nächster Nähe zu ihr überzufällig häufig Adenosin und Uracil sind. Diese AU-Anreicherung im Bereich der Bindungsstellen ist noch nicht zufriedenstellend erklärt. Eine Hypothese legt eine Veränderung der

Sekundärstruktur der RNA durch den hohen AU-Anteil hin zu einer besseren Zugänglichkeit für den Regulationskomplex nahe. Außerdem zeigen effektive Bindungsstellen häufig zusätzliche Watson-und-Crick Basenpaarung an Position 12-17 der miRNA – also ca. 10 Basenpaare abseits des *seed*. Für diese Beobachtung gibt es aktuell nur hypothetische Modelle, die eine besondere Sekundärstruktur der beiden Nukleinsäuren im Argonautenproteinkomplex nahelegen, die zwar eine effektive Bindung, aber keine Verdrillung der Helices herbeiführen (Bartel, 2009).



**Abbildung 37:** Hypothetische Sekundärstruktur einer in das Argonautenprotein geladenen miRNA mit einer 8mer-Bindung an den Zielstrang, einem Adenosin in Pos. 1 der Zielsequenz sowie zusätzlicher 3'-Basenpaarung an den Pos. 13-16. Grau: Das Argonautenprotein. Rot: miRNA. Blau: Ziel-mRNA. Beachte das Adenosin in Pos. 1 des Zielstrangs sowie die dem Zielstrang abgewandten 1. Base der miRNA. (Abb. entnommen aus (Bartel, 2009); modifiziert und übersetzt)

Zusammenfassend sind die Basenpaarung am sog. Seed (*seed pairing*), die Konservierung und der Kontext der Bindungsstelle für Unterscheidung einer „falsch positiven“ Vorhersage von einer biologisch aktiven Bindungsstelle relevant. Betrachtet man die hier gefundene Bindungsstelle der miR-503 in der 3'UTR des RAF1-Gens unter diesen Gesichtspunkten, weist sie mehrere Eigenschaften auf, die für ihre biologische Aktivität sprechen: Zunächst liegt in der *seedregion* ein sog. *7mer-1A* vor (siehe Tab. 18 und Abb. 36). Dies entspricht Basenpaarungen von Pos. 2-7 (*7mer*) der miRNA und zusätzlich einem Adenosin an Pos. 1(*1A*). Nach einer Hypothese von Bartel interagiert das Adenosin an der 1. Stelle direkt mit dem Argonautenprotein. Die Bindung an das - in diesem Fall passende - Uracil der miRNA erfolgt nicht, da die in das Argonautenprotein geladene miRNA (siehe Abb. 37) ihre 1. Base dem Zielstrang abwendet (Bartel, 2009).





berücksichtigt der TargetScan Algorithmus für die Analyse dieser Bindungsstelle die zusätzlichen Basenpaarungen nicht für seine Vorhersage und die Berechnung seines Kontextscores, weshalb der Punktwert für das sog. *3'supplementary-pairing* nicht sehr ausgeprägt ausfällt (s.u.). Die Position der Bindungsstelle in der UTR ist allerdings vielversprechend: Sie liegt ca. 100 Basenpaare abseits des Stoppcodons und ist so vor dem Translationskomplex geschützt. Trotzdem liegt sie nicht in der Mitte dieser langen untranslatierten Region, was einen Punktwert von -0,038 ergibt (je niedriger, desto höher die Wahrscheinlichkeit der Bindung).

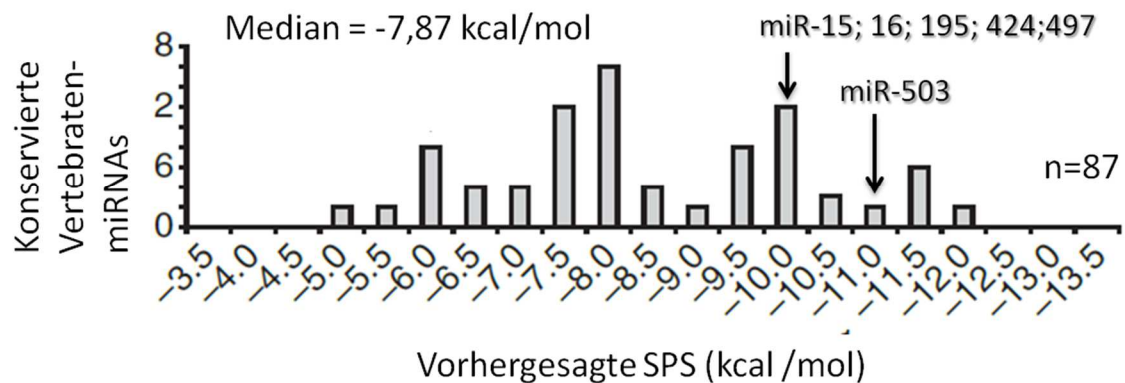
**TargetScan Version 6.2:**  
**Bindungsstellenanalyse: miR-503 in RAF1-3'UTR**

		predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	site-type contribution	3' pairing contribution	local AU contribution	position contribution	TA contribution	SPS contribution	context+ score	context+ score percentile	conserved branch length	P <sub>CT</sub>
Position 108-114 of RAF1 3' UTR	5'	...GUUUUCAGAGAAGCUGCUAA...	7mer-1A	-0.074	0.004	0.027	-0.038	-0.019	-0.066	-0.17	60	3.535	0.85
hsa-miR-503	3'	GACGUCUUGACAAGGGCGACGAU											

**Abbildung 39:** Ergebnisse der Bindungsstellenanalyse mit Version 6.2 des TargetScan Algorithmus: Dargestellt ist v.l.n.r.: Die Sequenz der Bindungsstelle mit Markierung der Seedregion durch vertikale Balken, der Grad der Basenpaarung an der Bindungsstelle (*seed match*: 7mer-1A) und die Punktwerte für die einzelnen Komponenten des *context+-scores*: **1.)** den Grad der Basenpaarung (*site-type contribution*: -0,074); **2.)** die zusätzliche Paarung 3'-seitig der Bindungsstelle (*3'pairing contribution*: 0,004); **3.)** die Konzentration von Adenosin und Uracil im Bereich der Bindungsstelle (*local AU contribution*: 0,027); **4.)** den Abstand der Bindungsstelle zum Ende der UTR (*position contribution*: -0,038); **5.)** das Ausmaß des Überflusses anderer Bindungsstellen der gleichen miRNA (*target-site abundance, TA contribution*: -0,019) und **6.)** die Stabilität der Basenpaarung (*seed-pairing stability, SPS contribution*: -0,066). Der *context+-score* mit -0,17 für diese Bindungsstelle ist höher als für 60% aller anderen Bindungsstellen der miR-503. Die Bindungsstelle ist außerdem hochkonserviert (der Grenzwert des *conserved branch length score* liegt für einen 7mer-1A bei 1,6; diese Bindungsstelle liegt bei 3,535). Die Wahrscheinlichkeit, dass die Seedregion durch ihre Funktion als miRNA-Bindungsstelle konserviert wurde (und nicht zufällig) wird als *Bayes-Schätzer* der Wahrscheinlichkeit aus einer Signal/Hintergrund Relation berechnet und liegt bei 0,85. (Whitehead Institute for Biomedical Research, 2013)

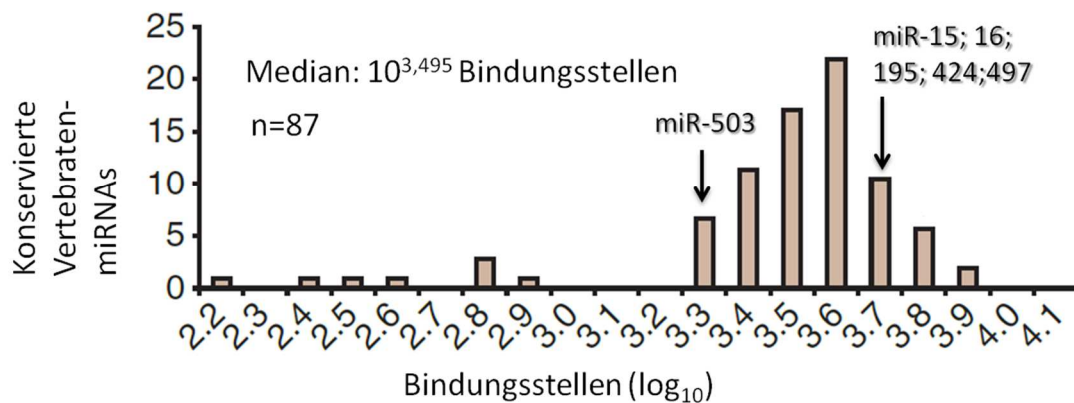
Eine hohe Konzentration von Adenosin und Uracil um die Bindungsstelle liegt hingegen nicht vor, was einen positiven (und damit die Wahrscheinlichkeit der Bindung erniedrigenden) Punktwert von 0,027 ergibt. Nachdem Garcia et al. 2011 zeigen konnten, dass die Stabilität der Basenpaarung (*seed-pairing stability, SPS*) und das Ausmaß des Überflusses anderer Bindungsstellen der gleichen miRNA (*target-site abundance, TA*) die generelle Fähigkeit einer miRNA zur Zielregulation

(*targeting proficiency*, i.e. "Tüchtigkeit") beeinflussen, wird dies seit Version 6 des Algorithmus in die Berechnung mit einbezogen; es erhöht die Vorhersagewahrscheinlichkeit einer effektiven Bindungsstelle (Garcia *et al.*, 2011). Die Stabilität der Basenpaarung der Seedregion der miR-503 ist (für einen 7mer-m8) mit -10.93 kcal/mol deutlich stärker als der Median der konservierten Vertebraten-miRNAs von -7,87 kcal/mol (siehe Abb. 40).



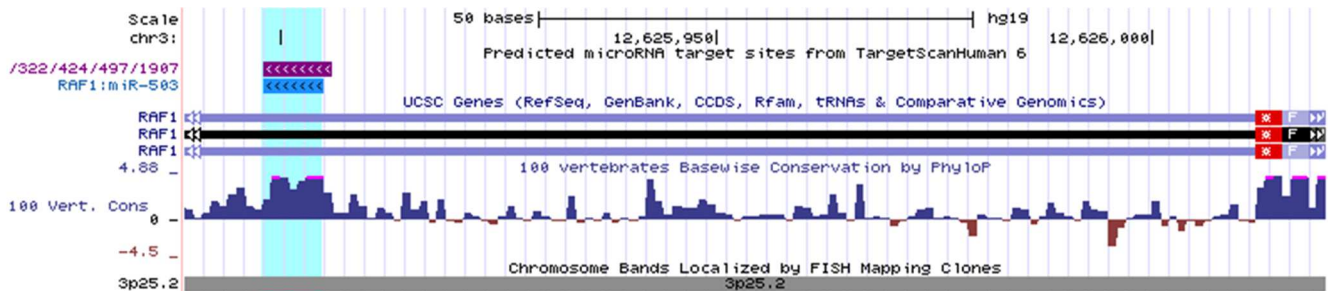
**Abbildung 40:** Die vorhergesagte Stabilität (*seed-pairing stability*, SPS) der Basenpaarung für die miR-503 liegt (für einen mit 7mer-m8) bei -10.93 kcal/mol und damit deutlich über dem Median der konservierten Vertebraten-miRNAs von -7,87 kcal/mol. Die Bindung der anderen Mitglieder der Familie (miR-15a;miR-16;miR-15b;miR-195;miR-424;miR-497) ist mit -10,23 nur wenig instabiler. (übersetzt und modifiziert nach (Garcia *et al.*, 2011))

Betrachtet man die Anzahl der Bindungsstellen im gesamten Genom (*target-site abundance, TA*) liegt die miR-503 hier deutlich unter dem Median aller miRNAs und - bemerkenswerterweise - auch deutlich unter der Bindungsstellenzahl ihrer Familienmitglieder (siehe Abb. 41). Es ist daher denkbar, dass die miR-503 in ihrer Familie eine spezialisierte Funktion einnimmt, um im Vergleich relativ wenig Ziele dafür besonders effektiv zu supprimieren.



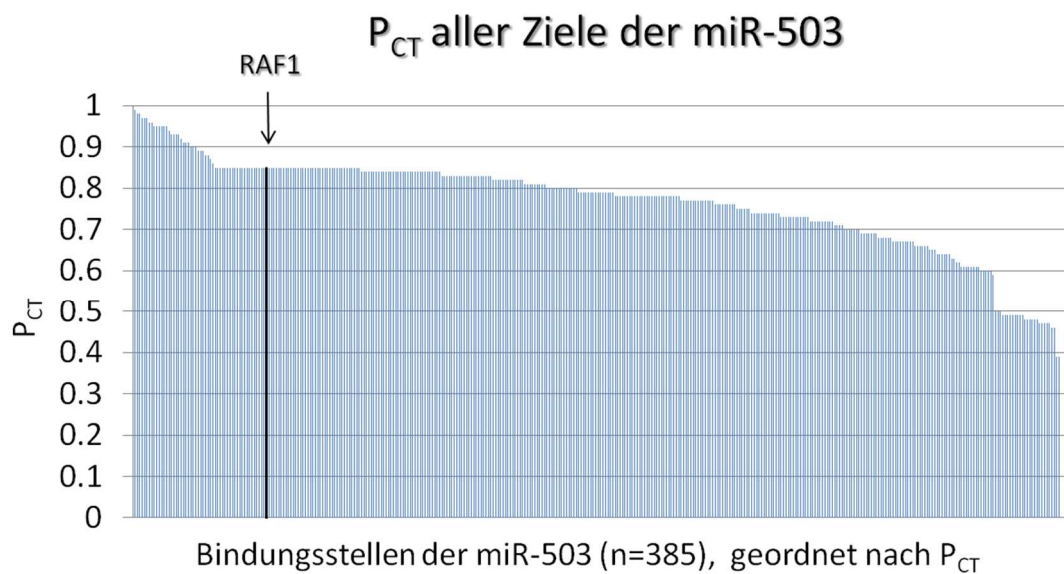
**Abbildung 41:** Die Anzahl der vorhergesagten Bindungsstellen im Genom für die miR-503 liegt bei  $10^{3,296}$  (42. Perzentile). Sie liegt unter dem Median von  $10^{3,495}$ . Vergleiche auch die deutlich höhere Anzahl an Bindungsstellen der anderen Mitglieder des Clusters: Die Familie miR-15a;miR-16;miR-15b;miR-195;miR-424;miR-497 erreicht  $10^{3,667}$  Bindungsstellen (90. Perzentile). (übersetzt und modifiziert nach **(Garcia et al., 2011)**)

Betrachtet man als letzten Faktor die Konservierung der Bindungsstelle, fällt zunächst ein hoher Grad der Konservierung der Seedregion im Vergleich zu den benachbarten Nukleotiden der UTR auf. Der *conserved branch length score*, ein Punktwert zur Bewertung der Konservierung, liegt für diese Bindungsstelle bei 3,535. Der Grenzwert, nachdem ein 7mer-1A als konserviert gilt, liegt bei >1,6.



**Abbildung 42:** Auszug aus dem UCSC-Genomatlase: Gezeigt ist die 3'-untranslatierte Region des humanen RAF1-Gens auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 an Position 12.625.950 [3p25.2]: 1. Zeile: Skala (50 Basen). 2. Zeile: Positionsmarkierung. 4. Zeile links in türkis markiert: Die potentielle Bindungsstelle der miR-503. Darüber in weinrot überlappend: Die Bindungsstelle der anderen Mitglieder der miR-15/16 Familie. Zeilen 5-7: Das RAF1-Gen. Mit einem weißen Stern auf rotem Grund ist rechts das Stoppcodon des RAF1-Gens markiert. In dieser Darstellung wird die entstehende mRNA von rechts (5') nach links (3') translatiert, so liegt rechts vom Stoppcodon das Codon der letzten Aminosäure des RAF1-Proteins (F=Phenylalanin). 8. Zeile: Grad der Konservierung (mittels *phastCons* und *phyloP*) in 100 Vertebratenarten („100 Vert. Cons“): Je höher der in Richtung der Y-Achse als Balken aufgetragene Score, desto höher ist der Grad der Konservierung der jeweiligen Base. Der Ort der potentiellen Bindungsstelle (türkis hinterlegt) ist hochgradig konserviert - vergleichbar mit dem Stoppcodon. (UCSC, 2014)

Die Wahrscheinlichkeit, dass die Seedregion durch ihre Funktion als miRNA-Bindungsstelle konserviert wurde (und nicht zufällig) wird als *Bayes-Schätzer* ( $P_{CT}$ ) der Wahrscheinlichkeit aus einer Signal/Hintergrund Relation für die spezifische Nukleotidsequenz berechnet und liegt bei 0,85. Vergleicht man diese Wahrscheinlichkeit mit allen vorhergesagten Bindungsstellen der miR-503 liegt die RAF1-Bindungsstelle an Platz 55 von 385.



**Abbildung 43:** Aufgetragen sind die  $P_{CT}$  Werte aller Zielgene der miR-503 als Säulendiagramm.  $n=385$ . Maximalwert: 0,99, Minimalwert: 0,01. Schwarz markiert ist der Wert für RAF1: 0,85. (Rang: 55 von 385). Median: 0,79. Mittelwert: 0,77; Quantilsrang: 76%.

Damit erscheint die Sequenz der Bindungsstelle mit großer Wahrscheinlichkeit nicht zufällig konserviert zu sein, sondern aufgrund der Funktion als miRNA-Bindungsstelle erhalten worden zu sein ( $P_{CT}$  größer als 75% aller Bindungsstellen dieser miRNA). In einem Vergleich mit einem bereits experimentell validierten Ziel der miR-503, der 3'-UTR des Cyclin-D1-Gens (CCND1), zeigt diese Bindungsstelle eine vergleichbare, teilweise (z.B. bei Konservierung in Kontext) sogar höhere Wahrscheinlichkeit einer biologisch relevanten Bindung. Einschränkend muss hingegen beachtet werden, dass in der CCND1-3'-UTR zwei Bindungsstellen liegen, die synergistisch wirken können und somit für einen biologischen Effekt auch zwei niedrig effektive Bindungsstellen vorliegen könnten (vgl. Abb. 44) (Liu *et al.*, 2008).

## TargetScan Version 6.2

### Vergleich Bindungsstellen der miR-503 in RAF1 und CCND1

		predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	site-type contribution	3' pairing contribution	local AU contribution	position contribution	TA contribution	SPS contribution	context+ score	context+ score percentile	conserved branch length	P <sub>CT</sub>
Position 108-114 of RAF1 3' UTR	5'	...GUUUUCAGAGAAGCUGCUGCUAA...	7mer-1A	-0.074	0.004	0.027	-0.038	-0.019	-0.066	-0.17	60	3.535	0.85
hsa-miR-503	3'	GACGUCUUGACAAGGCGACGAU											
Position 1960-1967 of CCND1 3' UTR	5'	...UCCAUUUUUUUUUUGCGCUGCUA...	8mer	-0.247	0.003	0.054	0.195	-0.030	-0.110	-0.14	44	0.987	< 0.1
hsa-miR-503	3'	GACGUCUUGACAAGGCGACGAU											
Position 2034-2040 of CCND1 3' UTR	5'	...UCUUUCACAUUGUUU--GCUGCUAU...	7mer-1A	-0.074	-0.006	-0.020	0.076	-0.019	-0.066	-0.11	32	2.899	0.84
hsa-miR-503	3'	GACGUCUUGACAAGGCGACGAU											

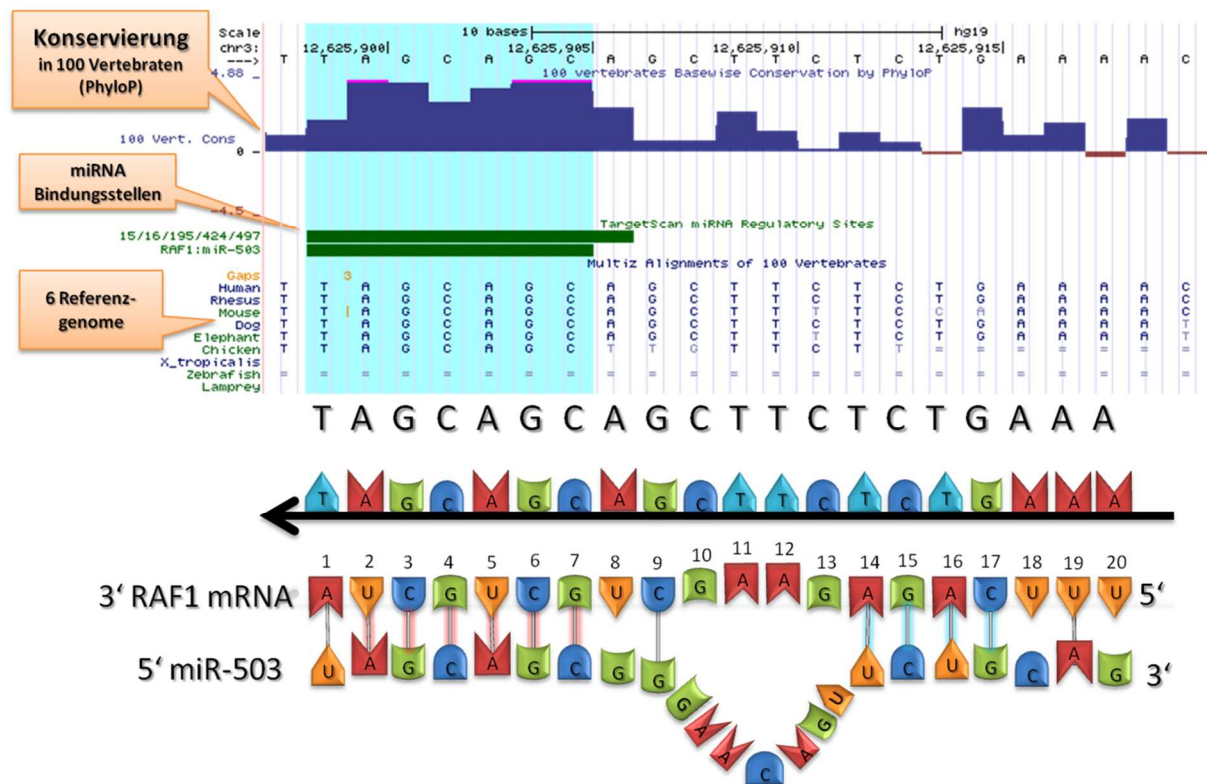
**Abbildung 44:** Vergleich der vorhergesagten Bindungsstellenanalyse der miR-503 in der RAF1-UTR mit 2 bereits experimentell validierten Bindungsstellen der miR-503 in der untranslatierten Region des CylcinD1-Gens (CCND1-3'-UTR): Die seedabhängigen Punktwerte sind mit der 7mer-1A CCND1-Bindungsstelle identisch (TA, SPS). Der *context+ score* und die Konservierung (*conserved branch-length score*) sprechen der Bindungsstelle in der RAF1 UTR eine höhere Bindungswahrscheinlichkeit zu als den beiden CCND1-Bidnungsstellen. Allerdings können in der UTR des CCND1-Gens zwei Bindungsstellen synergistisch wirken; in der UTR des RAF1-Gens liegt nur eine Bindungsstelle. (UCSC, 2014)

Der TargetScan Algorithmus lässt für die Berechnung seines *context+ scores* die beschriebene zusätzliche Bindung der Basenpaare 14-17 außer Acht, er berücksichtigt 3'-akzessorische Basenpaarung nur an den Nukleotiden 13-16. Um einzuschätzen, ob diese zusätzlichen Basenpaarungen trotzdem biologisch relevant sind wurde die Betrachtung der Konservierung auf diese Basenpaare ausgedehnt: Die Nukleotide 14-17 der Bindungsstelle sind nicht konserviert (siehe Abb. 45), insbesondere sind die Nukleotide 16 und 17 bereits in der Maus nach C+A mutiert. Eine biologisch relevante, akzessorische Basenpaarung 3'-seitig des Seeds (auf mRNA Seite) erscheint aufgrund der fehlenden Konservierung sehr unwahrscheinlich. Wenn Sie auftritt, müsste sie ein Spezifikum des Homo sapiens sein. Hierzu kann die Stabilität der Bindung unter zielgerichteter Mutation dieser Basenpaare untersucht werden. Dies kann allerdings nicht in dem hier angewandten murinen Zellsystem untersucht werden, da das Mausgenom hier Sequenzabweichungen aufweist. Diese Untersuchungen müssen an humanen Zelllinien durchgeführt werden.

Zusammenfassend ist die Wahrscheinlichkeit der biologischen Regulation des RAF1-Gens durch die miR-503 an der definierten Bindungsstelle 108-114 der UTR hoch:



## USCS Genome Browser on Human (02/2009 GRCh37/hg19)



**Abbildung 45:** Basenweise Darstellung der Konservierung der Bindungsstellenregion. von unten nach oben: Unterste Zeile (5'miR-503): Darstellung der miR-503 mit der Seedregion (links, rot markiert) und den potentiellen 3'-akzessorischen Basenparungen der Nukletotide 14-17+19 (rechts, blau markiert). Darüber der komplementäre Abschnitt der 3'UTR der RAF1-mRNA. Darüber (auf dem schwarzen Pfeil) die entsprechende DNA-Sequenz (Antisense-Strang des RAF1-Gens), von der die RAF1-mRNA in Pfeilrichtung transkribiert wurde. Darüber in Klartext die humane DNA-Sequenz nach UCSC 02/2009 Referenzgenom. Darüber die Sequenzen der sechs Referenzgenome zum Konservierungsvergleich (v.o.n.u.: Mensch, Rhesusaaffe, Maus, Hund, Elefant, Huhn). Darüber in dunkelgrün die Bindungsstelle der miR-503 und direkt darüber (ein Basenpaar länger) die der anderen Mitglieder der miRNA-Familie. Mit türkischem Hintergrund ist der Bereich der Seedregion hinterlegt. An oberster Stelle ist als Säulendiagramm der Grad der Konservierung jeder Base in 100 Vertebratenarten (PhyloP) aufgetragen. Man erkennt, dass Position 1 schwach konserviert ist. Die Seedregion (nt 2-7) ist hochgradig konserviert. Die folgenden Basen, insb. die Nukleotide 14-16 sind nicht konserviert. Die Nukleotide 16+17 sind bereits im Mausgenom nach C+A mutiert. (Konservierung nach PhyloP aus dem UCSC Genome Browser (**UCSC, 2014**). Darstellung der Basenpaarung: C. Mann)

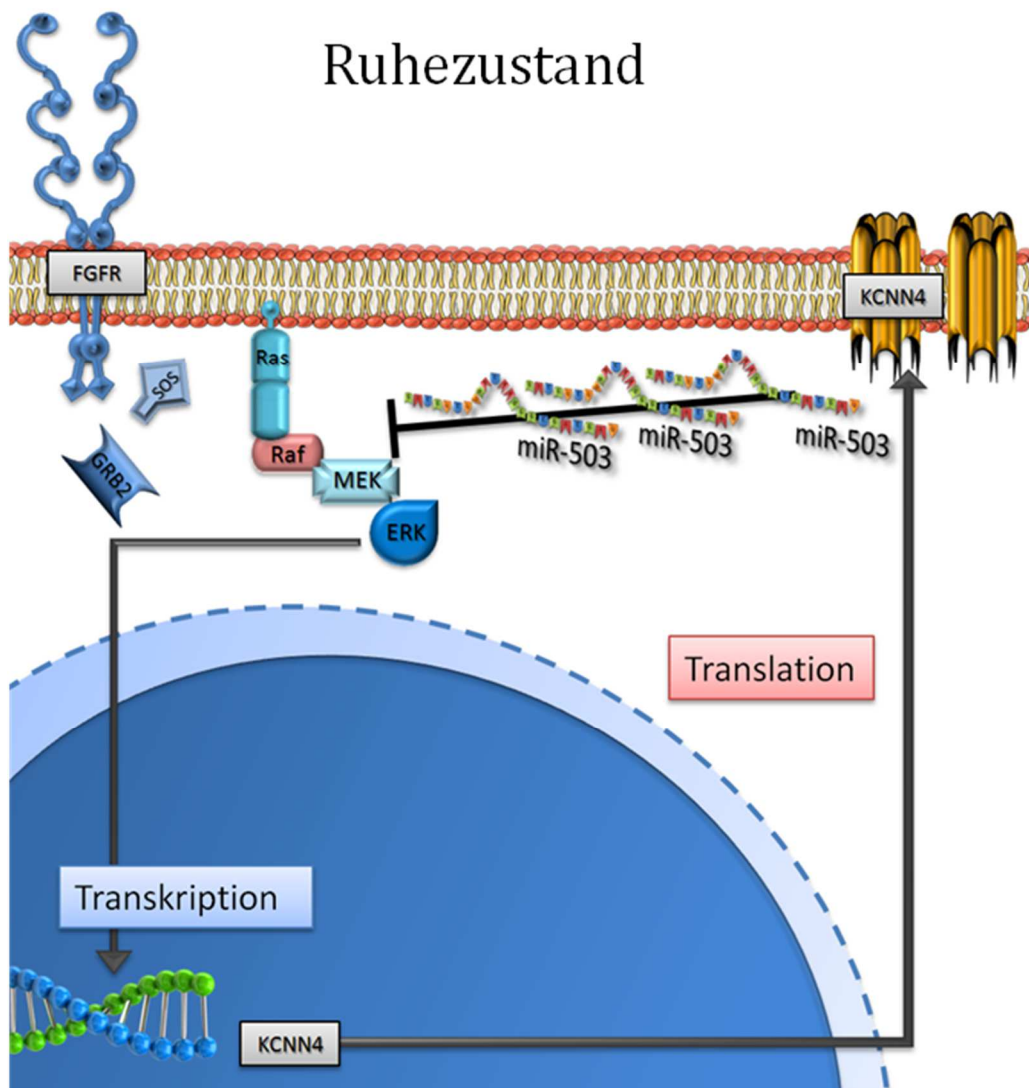
Die Kontextfaktoren (siehe Tab. 18) erbringen in Ihrer Kombination einen Kontextpunktwert von -0,17, was über den Kontextpunktwerten von 60% der

anderen Bindungsstellen der miR-503 liegt. Außerdem ist die Bindungsstelle (der *7mer-1A*) überdurchschnittlich gut konserviert ( $P_{CT}$  größer als 75% aller Bindungsstellen dieser miRNA) ist, wobei die Bindung wahrscheinlich auf konservierter Basenpaarung in der Seedregion beruht und 3'-akzessorische Basenpaarungen nicht relevant sind.

#### **4.4 Regulationshypothese des KCNN4 durch miR-503**

Aus dieser hochwahrscheinlichen Repression von RAF1 durch miR-503 lässt sich die folgende Regulationshypothese ableiten: In Ruhe liegt in der Zelle eine relativ hohe miR-503 Konzentration vor. Die Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade ist bei fehlender Stimulation (z.B. durch Wachstumsfaktoren) wenig aktiv. Die niedrige Aktivität der Kaskade wird zusätzlich durch die hohe miR-503 Konzentration und einen resultierenden RAF-1 Mangel gehemmt. Es resultiert wenig ERK-Aktivität. Es wird wenig KCNN4-mRNA transkribiert und dementsprechend sind wenig KCNN4-Kanäle in der Zellmembran aktiv (Abb. 46).

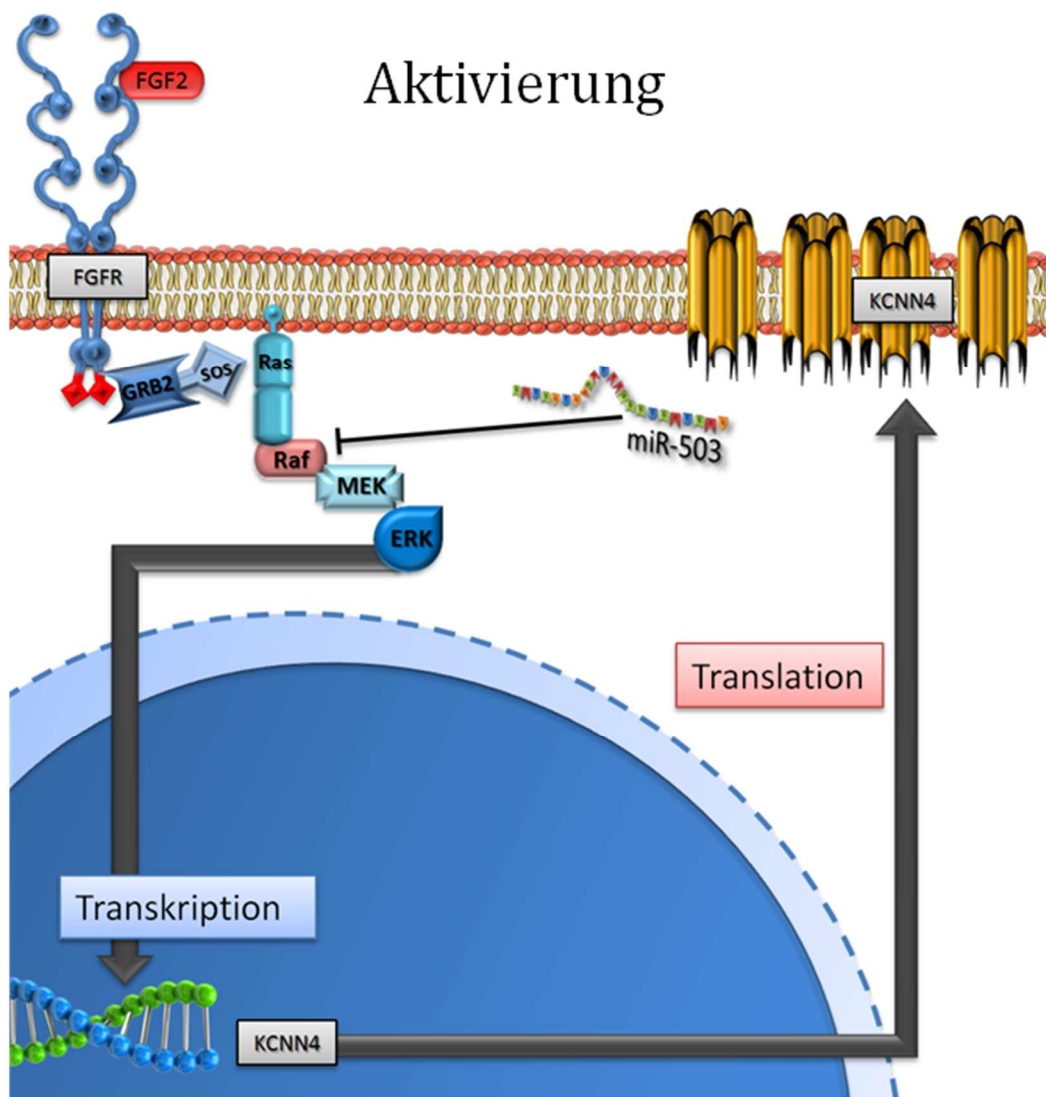




**Abbildung 46:** Hypothese der Regulation von KCNN4 durch miR-503. Darstellung des Ruhezustandes ohne Wachstumsfaktorbindung: Die Kinasedomäne des FGF-Rezeptors ist nicht aktiv; die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade ist wenig aktiv. Zusätzlich liegt eine hohe Konzentration von miR-503 vor, die die Kaskade zusätzlich an RAF-1 hemmt. Resultierend wird wenig KCNN4 transkribiert und translatiert. Es sind nur wenige Kanäle in der Zellmembran aktiv. (eigene Darstellung mit Material der Microsoft-Bitmaplibrary)

Bindet ein Wachstumsfaktor (in diesem Beispiel FGF-2) an den FGF-Rezeptor, erfolgt zunächst die Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomänen des Rezeptors. GRB2 und SOS werden an den Rezeptor rekrutiert und aktivieren die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade. Zusätzlich sinkt, über einen noch unbekannten Mechanismus, die Konzentration der miR-503 und die Synthese von RAF1 wird weniger gehemmt. Die enthemmte Kaskade stimuliert durch die erhöhte ERK-Aktivität u.a. die Transkription zahlreicher Effektorgene. So

wird auch vermehrt KCNN4 mRNA transkribiert. Mehr Kanalproteine werden translatiert und in die Membran transloziert (Abb. 47).



**Abbildung 47:** Darstellung der Aktivierung nach Wachstumsfaktorbindung: Die Kinasedomäne des FGFR-wird durch Bindung von FGF-2 aktiviert. Nach der Autophosphorylierung werden GRB2 und SOS rekrutiert, die die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade aktivieren. Zusätzlich erfolgt durch die niedrigere miR-503-Konzentration eine Enthemmung von Raf. Durch diese synergistischen Effekte wird vermehrt KCNN4 transkribiert und translatiert. Die erhöhte Anzahl von Kanälen in der Zellmembran stellen eine erhöhte Kaliumleitfähigkeit bereit. (eigene Darstellung mit Material der Microsoft-Bitmaplibrary)

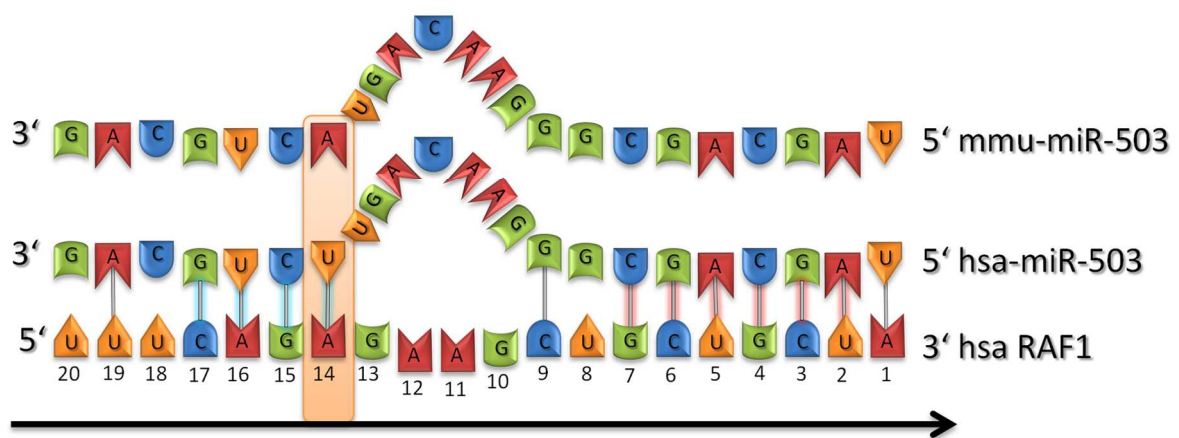
Die Enthemmung der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade durch die niedrigere miR-503 Konzentration erfolgte diesem Modell nach synergistisch zur durch den Wachstumsfaktor induzierten Aktivierung der Kaskade: FGF-2 und die miR-503 kooperieren. Denkbar ist ebenfalls, dass die größere Aktivierung der Kaskade

durch den Wachstumsfaktor über die miRNA eine „Feineinstellung“ anhand der RAF1 Hemmung erfährt. Die hier dargestellten Experimente, bei denen nur mit einer Konzentration stimuliert wurde und die miRNA nur zu einem Zeitpunkt quantifiziert wurde, sind für eine Aussage hierzu allerdings nicht ausreichend.

## 4.5 Einschränkungen und Ausblick

Das eingesetzte in-vitro-Fibrosemmodell nutzt eine murine Zelllinie von Nierengewebsfibroblasten. Es ist bereits gezeigt worden, dass sich die Ergebnisse dieses in-vitro Fibrose Modells zum Beispiel hinsichtlich der Kanalsexpression in-vivo in Maus und Ratte reproduzieren lassen (Grgic *et al.*, 2009). Ebenso ist die gefundene miRNA-503 in Maus und Mensch hochgradig konserviert:

### Sequenzvergleich der murinen und der humanen miR-503



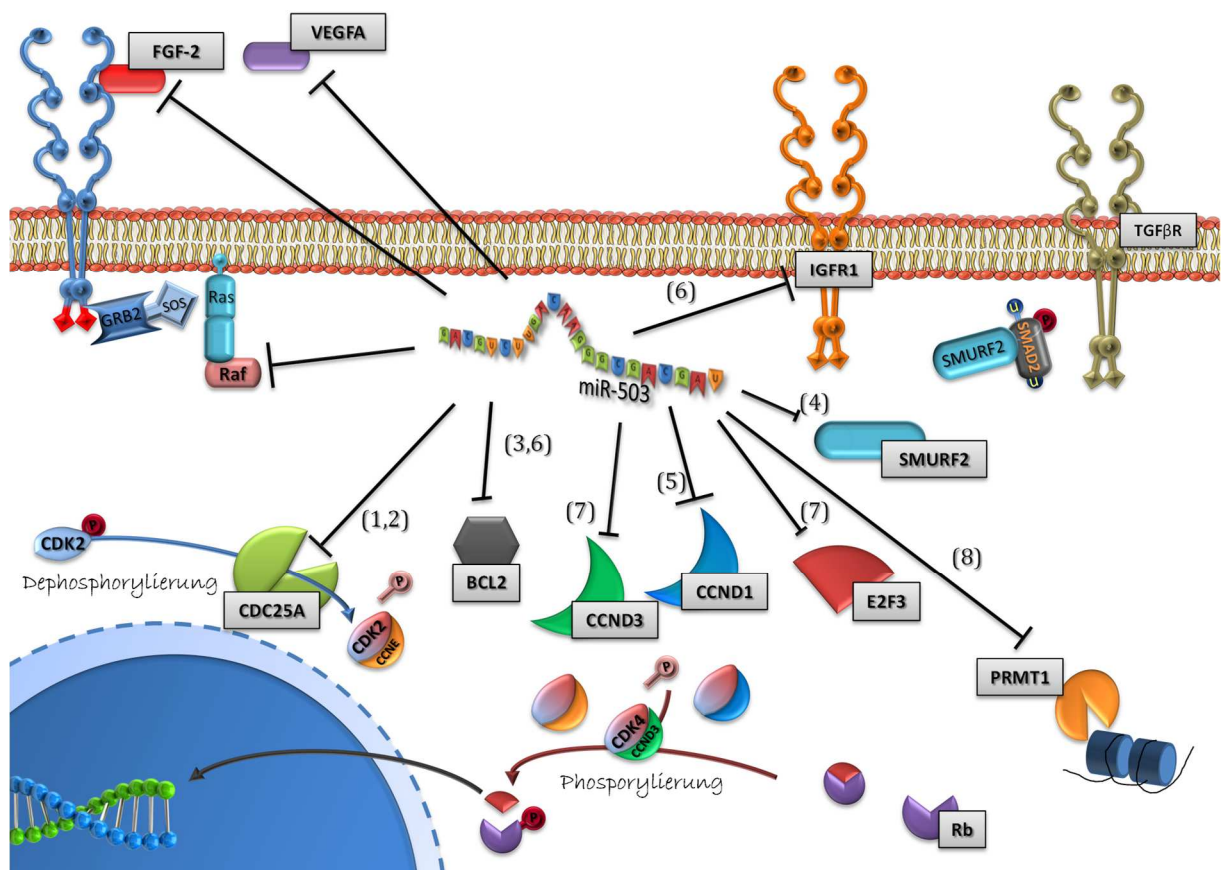
**Abbildung 48:** Sequenzvergleich mmu\_miR-503 (murin) und hsa\_miR-503 (human). Nur eine Base an Pos. 14 ist nicht konserviert (gelb hinterlegt). (C. Mann)

Nur an Position 14 ist das Uracil nach Adenosin mutiert. Wie oben gezeigt wurde, findet an dieser Stelle mit hoher Wahrscheinlichkeit keine 3'-akzessorischen Basenpaarung statt. Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass die gezeigten Veränderungen des miRNA-Expressionsprofils spezifisch für die genutzte murine Zelllinie sind. Die durchgeführte in-silico Bindungsstellenanalyse zeigt eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine biologische Relevanz der Interaktion zwischen miR-503 und RAF1. Diese Annahme sollte molekularbiologisch validiert werden. Bei den hierzu notwendigen weiteren Untersuchungen empfiehlt es sich, mit einem Luciferaseassay in einem humanen System zu arbeiten, womit neben dem gezielten Nachweis der Bindung auch der Ausschluss eines „Speziesbias“ bei der Übertragung von der Maus in das humane System möglich ist. In einem solchen System kann mit dem Einsatz von Antago-miR und Ago-miR eine detaillierte Beschreibung des Einflusses der miR-503 auf die Proliferation von Fibroblasten

und die Expression des Ionenkanals stattfinden. Ausgehend von Zellkulturuntersuchungen würde sich anschließend eine Übertragung in die Klinik mit einem translationalen Ansatz anbieten. Hierzu kann zunächst deskriptiv die Expression der miRNA in den Nierenbiopsien Gesunder mit Biopsien von Patienten, die an einer fibrotischen Nierenerkrankung leiden, verglichen werden. Auch der Einsatz von miR-503 im Tiermodell zur Prophylaxe einer Nierenfibrose erscheint mit der Verfügbarkeit von Systemen zur effektiven intrazellulären Deposition von miRNAs denkbar.

Allerdings sollte der Blick nicht auf das in dieser Arbeit angewandte Modell (Fibroblasten als untersuchte Zellart, Nierenfibrose als pathophysiologisches Paradigma, RAF1 als Ziel) beschränkt bleiben. Die miR-503 hat bereits in verschiedenen anderen Modellen relevante biologische Effekte gezeigt: In Abschnitt 4.3 wurden bereits zwei Arbeiten von Forrest und Sarkar erwähnt, die zunächst zeigten, dass die Überexpression der miR-503 eine AML-M5 Ziellinie zur Differenzierung brachte (Forrest *et al.*, 2009), siehe Punkt **(1)** in Abb. 49) und zweitens, dass die miR-503 durch Inhibition von CDC25A für den Verbleib der inhibitorischen Phosphorylierung von CDK2 sorgt und so einen Zellzyklusarrest induzieren kann (Sarkar, Dey and Dutta, 2010), **(2)** in Abb. 49). Darüber hinaus sind während der Fertigstellung dieser Arbeit zahlreiche andere Untersuchungen zur Funktion der miR-503 veröffentlicht worden. Diese identifizieren zahlreiche Zielgene der miR-503, die den Zellzyklus oder die Proliferation beeinflussen und so die miR-503 zu einer hochvernetzten Schnittstelle in der Regulation von Zellproliferation machen: Navas und Kollegen beschrieben 2014, dass die Überexpression der miR-503 die Involution der Brustdrüse über die Zielgene BCL2, IGF1 und TGF $\beta$  hemmt (Llobet-Navas *et al.*, 2014), **(3)** in Abb. 48). Die Modulation des TGF $\beta$  / SMAD Signalweges fanden auch Cao und Kollegen: Sie identifizierten die E3-Ubiquitin-Ligase SMURF2, die Proteine (hier p-SMAD2) mittels Ubiquitylierung als Substrate des Proteasoms markiert und so zum Abbau freigibt, als Zielgen der miR-503 (Cao *et al.*, 2014), **(4)** in Abb. 49). Die Mitglieder der SMAD-Transkriptionsfaktorfamilie werden TGF- $\beta$  abhängig exprimiert. Sie inhibieren Proliferation durch die Induktion von Zellzyklusinhibitoren wie p27<sup>KIP</sup> und p15<sup>INK4b</sup> (Shi and Massagué, 2003). Dementsprechend sind intestinale Epithelzellen nach spezifischer Hemmung der miR-322 und miR-503 über die

Enthemmung von SMURF2 und dem dadurch gesteigerten Abbau von phosphoryliertem SMAD2 vor Apoptose geschützt (Cao *et al.*, 2014). Eine andere Arbeit identifizierte in einem ähnlichen Versuchssystem, (intestinales Epithel) das *CUG-bindende Protein 1* (CUGBP1), ein RNA-bindendes Protein mit breiter Translationsregulationsfunktion, als Ziel der miR-503 (Cui *et al.*, 2012). So modulieren miR-503 und miR-322 die Homöostase des Epithels einerseits direkt über Komponenten des TGF $\beta$ -Signalweges (SMURF2, SMAD) und andererseits indirekt über die Repression eines anderen breiten Translationsregulators (CUGBP1).



**Abbildung 49:** Zielstrukturen der miR-503 (schematisch) [C.Mann].

Die Zielgene im Bereich der Proliferation, der Epithelhomöostase und inflammatorischer Signalwege legen außerdem eine Betrachtung in der miR-503 in malignen Systemen nahe. Tatsächlich wurde die miR-503 bei zahlreichen Krebsarten untersucht:

In hepatozellulären Karzinomen (HCCs) ist miR-503 signifikant herabreguliert. Je niedriger Ihre Expression dort ist, desto schlechter ist die Prognose. Hierfür wird eine Enthemmung der Zellzyklusregulation verantwortlich gemacht: Xiao und Kollegen zeigten im HCC-Modell, dass miR-503 die G1/S-Phasentransition über CyclinD3 und E2F3 hemmt (Xiao *et al.*, 2013), **(7)** in Abb. 49). In dieser Arbeit wurden außerdem BALB/c-Nacktmäusen HCC-Zellen injiziert. Eine miR-503-mimic hemmte in diesem Versuch in vivo das Tumorwachstum. Eine andere Arbeit zeigte in-vitro, dass miR-503 die Migration von HCC-Zellen über die Protein-Arginin-Methyltransferase 1 (PRMT1) hemmt (Li *et al.*, 2015), **(8)** in Abb. 49), einem Genexpressionsregulator, der in zahlreichen malignen Zellen heraufreguliert ist (Yoshimatsu *et al.*, 2011). Ebenfalls in HCC-Zellen konnte gezeigt werden, dass miR-503 proangiogenetische Wachstumsfaktoren (VEGFA, FGF-2) hemmt (Zhou *et al.*, 2013). Die Hemmung der miR-503 wurde in dieser Arbeit durch Hypoxie induziert: Nach entsprechendem Stimulus wurde miR-503 durch einen durch Hypoxie induzierbaren Transkriptionsfaktor (HIF1 $\alpha$ ) herunterreguliert, was zu erhöhten VEGFA- und FGF-2-Spiegeln führte. Auch in gynäkologischen Tumoren ist die miR-503 oft herunterreguliert, was z.B. für das Endometriumkarzinom (Xu *et al.*, 2013) oder das Mammakarzinom (Long *et al.*, 2015) gezeigt werden konnte. In diesen beiden Fällen induziert sie, wie auch andere Mitglieder der miR-16 Familie (Liu *et al.*, 2008), einen Zellzyklusarrest, in diesem Fall über Cyclin-D1 (**(5)** in Abb. 49). Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom zeigen aktuelle Untersuchungen, dass die niedrige Expression der miR-503 unabhängiger Prädiktor für ein schlechtes Outcome ist (Liu, Qu and Zhong, 2015). Auch beim Magenkarzinom wurde die Expression der miR-503 untersucht: Hier gibt es Hinweise, dass Ihre Herabregulation mit Platinresistenz assoziiert ist. Als Zielgene identifizierten Wang *et al.* den IGF1-Rezeptor sowie erneut das Protoonkogen BCL2 (**(6)** in Abb. 49) (Wang *et al.*, 2014). Daneben scheint miR-503 beim Magenkarzinom einen „epithelialen Phänotyp“ zu bewirken und EMT zu inhibieren (Peng *et al.*, 2014). Allerdings enthält diese Studie nur Zellkulturdaten und die Charakterisierung der EMT beschränkt sich auf die Expression von vier Markern in der Zellkultur, so dass diese Aussage mit Vorsicht interpretiert werden muss. Auch für das Prostatakarzinom konnte gezeigt werden, dass miR-503 über die Ubiquitinligase RNF31 die Proliferation und Migration von Prostatakarzinomzellen hemmt (Guo, Liu and Wang, 2011). Neben diesen Arbeiten, die eine tumorsuppressive Wirkung

der miR-503 nahelegen, liegen auch Untersuchungen vor, die eine Heraufregulation dieser miRNA, z.B. in Retinoblastomen (Zhao *et al.*, 2008), Nebenschilddrüsenkarzinomen (Corbetta *et al.*, 2010) oder Nebennierenrindenkarzinomen (Özata *et al.*, 2011) zeigen. Allerdings beruhen diese Untersuchungen allesamt auf Microarraydaten, die nicht durch eine spezifische qPCR-validiert wurden, sodass deren Evidenz deutlich geringer anzusetzen ist als die Daten, die für eine Herabregulation der miR-503 in Krebserkrankungen sprechen.

Zusammenfassend interagiert miR-503 mit zahlreichen für die Zellproliferation relevanten Effektoren: Sie wirkt einerseits direkt auf proliferationsrelevante Zielgene und andererseits indirekt durch die Repression zwischengeschalteter Transkriptionsfaktoren (PRMT1) oder Translationsregulatoren (CUGBP1), die ihrerseits zahlreiche Zielgene regulieren. Dadurch wird die Zahl der durch eine Expressionsänderung der miRNA beeinflussten Ziele potenziert und rasch unüberschaubar groß. Im Folgenden wird die biologische Bedeutung der miR-503 kategorisiert nach den derzeit bekannten molekularbiologischen Funktionen dargestellt.

miR-503 wirkt proapoptotisch, zum Beispiel in der Epithelhomöostase (SMURF2, SMAD, CUGBP1) oder durch die Inhibition anti-apoptotischer Signale (BCL2). Sie interagiert mit zahlreichen Regulatoren des Zellzyklus, deren Suppression zu einem Zellzyklusarrest am Übergang von der G1 zur S-Phase (CCND1, CCND3, E2F3, CDK2) oder von der G2-Phase zur Mitose führt (CDC25A). Außerdem hemmt sie epigenetische Transkriptionsregulatoren, die posttranslationale Modifikationen beispielsweise an Histonproteinen durchführen (PRMT1). Unter Ihren Zielen sind weiterhin Akteure des Ubiquitinstoffwechsels (SMURF2, RNF31) und zahlreichen Wachstumsfaktoren (IGF1, VEGFA, TGF $\beta$ ), u.a auch der in dieser Arbeit als mitogenes Stimulanz eingesetzte FGF-2. Nicht zuletzt befinden sich unter Ihren Zielen mehrere prominente Onkoproteine: Neben BCL2 und CyclinD1 auch das von uns untersuchte RAF1.

Dies lässt vermuten, dass die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Herabregulation der miR-503 in proliferierenden Fibroblasten pars pro toto für ein weiter verzweigtes regulatorisches Netzwerk steht, in dem miR-503 eine wichtige



Schaltstelle zur Steuerung von Proliferation einnimmt. Durch die Vereinigung zahlreicher verschiedener Zielgene ist es denkbar, dass sie eine koordinierende Funktion in der zellulären Proliferationsmaschinerie einnimmt, in dem sie Mechanismen wie Apoptose, Zellzyklus, Inflammation und Wachstumsfaktorsekretion aufeinander abstimmt. Dies geschieht unter anderem durch epigenetische Mechanismen wie die posttranslationalen Modifikationen an Proteinen und Histonen. Diese Effekte sind nicht auf Fibroblasten beschränkt: Die Effekte wurden in vielen verschiedenen benignen und malignen Modellen und in zahlreichen Zelltypen gefunden. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich um einen weitverbreiteten, grundlegenden Mechanismus handelt, mit dem miR-503 über Proliferation, Apoptose und Zellzyklus Einfluss auf den Umsatz von Zellen nimmt. Als Ziel zukünftiger wissenschaftlicher Arbeit bieten sich nicht nur die Erforschung dieser Mechanismen an, sondern es drängt sich auch die noch unbeantwortete Frage auf, wie die miR-503 selbst reguliert wird.

## 5. Zusammenfassung

Chronische Nierenkrankungen mit einer Funktionsverschlechterung bis zur terminalen Niereninsuffizienz stellen ein zunehmendes, weltweites Gesundheitsproblem dar. Die gemeinsame pathophysiologische Endstrecke der verschiedenen zugrundeliegenden Nierenerkrankungen mündet in einen Fibrosierungsprozess mit Ersatz von funktionalem Parenchym durch Bindegewebe. Eine entscheidende Rolle des Umsatzes von extrazellulärer Matrix in diesem Prozess spielen aktivierte, proliferierende Fibroblasten. Zur Proliferation exprimieren Sie verstärkt einen calciumabhängigen Kaliumkanal (Synonym: KCNN4, IKca1). Es wird davon ausgegangen, dass dieser Kanal bei dem für die Proliferation notwendigen Calciumeinstrom durch seine Öffnung Membranleitfähigkeit für einen Kaliumausstrom herstellt und so verhindert, dass die Depolarisation der Membran dem weiteren Einstrom der 2-fach positiv geladenen Calciumionen entgegenwirkt. Die Expression dieser Kanäle ist in fibrotischen Nieren gesteigert. Ihre spezifische pharmakologische Blockade oder der genetische Knock-Out vermindern Proliferation von Fibroblasten *in-Vitro* und schützt Mäuse und Ratten vor einer durch unilaterale Ureterobstruktion induzierten Nierenfibrose *in-Vivo*.

Über die zugrundeliegenden Prozesse, die zur Heraufregulation des Kanals bei Fibrose führen, ist bisher wenig bekannt. Es wurde gezeigt, dass der Kanal der Regulation durch die RAS/RAF/Mek/Erk Kaskade unterliegt. Ziel dieser Arbeit war es, die Regulationsmechanismen des Kanals zu untersuchen und die Frage zu beantworten, ob microRNAs eine Rolle in der Expressionsregulation des KCNN4 spielen.

Dazu wurde zunächst ein *in-Vitro* Fibrosemodell an kultivierten, murinen Nierengewebsfibroblasten etabliert. Nach Stimulation mit dem profibrotischen Zytokin FGF-2 wurde die Proliferation der Fibroblasten in einem MTT-basierten Proliferationsassay, die Kanalexpression auf mRNA Ebene mit quantitativer PCR sowie die Proteinfunktion des Kanals mittels Patch Clamp untersucht. Nachdem dieses *in-Vitro* Fibrosemodell seine Fähigkeit zur Steigerung der Proliferation, der Kanalexpression und der Kanalfunktion bewiesen hatte, wurde es herangezogen, um die Expression von miRNAs in einem miRNA-Microarray zu untersuchen.

Anschließend wurde das Ergebnis mittels miRNA-spezifischer, quantitativer real-time PCR validiert.

Die Proliferation der Fibroblasten war in der FGF-2-Gruppe signifikant erhöht ( $p < 0.001$ ). Außerdem verdoppelte sich die Expression des Kanals in der quantitativen PCR (+91%) sowie der KCNN4-spezifische Strom in der Patch Clamp Messung (+125%) nach FGF-2 Stimulation. Das MicroRNA-Microarray, in dem die Expression aller zu diesem Zeitpunkt bekannten MicroRNAs einer FGF-2-stimulierten Gruppe mit einer Kontrollgruppe verglichen wurde, zeigte mehrere miRNAs mit einer signifikanten Änderung ihrer Expression unter FGF-2 Stimulation. Hierunter zeigte miR-503 (ein Mitglied der miR-424 Familie) die stärkste Änderung ihrer Expression: Eine Verminderung der Expression um den Faktor 4. Diese Expressionsverminderung konnte in einer miR-503-spezifischen, quantitativen real-time PCR bestätigt werden. Daraufhin wurde ein Referenzgenom auf Bindungsstellen für diese miRNA untersucht. Es zeigte sich, dass KCNN4 selbst keine Bindungsstelle für miR-503 aufweist. Allerdings weist ein bekannter Upstreamregulator des Kanals, RAF1, eine Bindungsstelle der miR-503 in seiner 3'-untranslatierten Region auf. Es erfolgte eine *in-silico* Bindungsstellenanalyse, die eine hohe Wahrscheinlichkeit einer biologisch relevanten Bindung der miR-503 an RAF1 erbrachte.

Dies führt zu einer Regulationshypothese, in der nach profibrotischer Stimulation am FGF-Rezeptor die erhöhte Aktivität der RAS/RAF/Mek/Erk Kaskade sowie die Enthemmung von RAF1 durch erniedrigte miR-503 Aktivität in der Förderung der KCNN4-Expression kooperieren.

Die *in-silico* Analyse weiterer Ziele der miR-503 zeigt zahlreiche Gene, die in Prozesse der Proliferation und der Zellzyklusregulation involviert sind. Dies deutet daraufhin, dass miR-503 (und die miR-424 Familie) in ein komplexes Netzwerk zur Regulation von Proliferation eingebunden sind.

Diese Ergebnisse machen miR-503 zu einem interessanten Ziel zukünftiger Forschung in der Pathophysiologie von Erkrankungen, die auf vermehrter Zellproliferation basieren, wie beispielsweise Fibrose oder Krebserkrankungen.

## 6. Summary

**Background / Objectives:** Activated fibroblasts are key controllers of extracellular matrix turnover in kidney fibrosis, the pathophysiological end stage of chronic kidney disease. The proliferation of activated fibroblasts depends on the expression of the calcium-dependent potassium channel KCNN4. Expression of this ion channel is upregulated in fibrotic kidneys. Genetic and pharmacological blockade of KCNN4 inhibits fibrosis in vitro and in vivo. The mechanisms of upregulation of KCNN4 are poorly understood. **Methods:** We studied the regulation of KCNN4 and possible involvement of miRNAs in an in-vitro fibrosis model using murine kidney fibroblasts. We tested fibroblast proliferation, channel function, channel expression and expression regulation after FGF-2 stimulation. **Results:** Proliferation was significantly increased by FGF-2, channel current and expression were almost doubled (+ 91% and +125%, respectively). MiRNA microarray identified upregulation of miRNA-503. In -silico target prediction reveals RAF1-3'UTR harboring a binding site with a high probability of relevant suppression by miR-503. **Conclusions:** This data show *a)* a profound upregulation of KCNN4 in stimulated fibroblast and a downregulation of miR-503 *b)* leads to a hypothesis of regulation of KCNN4-expression via disinhibition of the Ras/Raf/MEK/ERK-cascade by miR-503 targeting RAF1 and *c)* makes miR-503 (and the miR-424-family) a relevant target for further research regarding diseases relying on increased cell-proliferation like fibrosis or cancer.

## Literaturverzeichnis

Agilent Technologies (2015) *Protokoll: miRNA Microarray System, Agilent Technologies*. Available at: [http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G4170-90011\\_miRNA\\_Protocol\\_3.1.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G4170-90011_miRNA_Protocol_3.1.pdf) (Accessed: 22 August 2016).

Aravin, A. A. *et al.* (2003) 'The Small RNA Profile during *Drosophila melanogaster* Development', *Developmental Cell*, 5(2), pp. 337–350. doi: 10.1016/S1534-5807(03)00228-4.

Bartel, D. P. (2004) 'MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function', *Cell*, 116(2), pp. 281–297.

Bartel, D. P. (2009) 'MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions', *Cell*, 136(2), pp. 215–233. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.

Berridge, M. V. and Tan, A. S. (1993) 'Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction', *Archives of biochemistry and biophysics*, 303(2), pp. 474–482. doi: 10.1006/abbi.1993.1311.

Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. and Görlich, D. (2004) 'Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs', *RNA*, 10(2), pp. 185–191. doi: 10.1261/rna.5167604.

Brugnara, C. (1997) 'Erythrocyte membrane transport physiology', *Current Opinion in Hematology*, 4(2), pp. 122–127.

Cabezón, T. *et al.* (2007) 'Expression of S100A4 by a variety of cell types present in the tumor microenvironment of human breast cancer', *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 121(7), pp. 1433–1444. doi: 10.1002/ijc.22850.

Cai, X., Hagedorn, C. H. and Cullen, B. R. (2004) 'Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs', *RNA*, 10(12), pp. 1957–1966. doi: 10.1261/rna.7135204.

Cao, S. *et al.* (2014) 'Inhibition of Smurf2 translation by miR-322/503 modulates TGF- $\beta$ /Smad2 signaling and intestinal epithelial homeostasis', *Molecular Biology of the Cell*, 25(8), pp. 1234–1243. doi: 10.1091/mbc.E13-09-0560.

Chang, H. Y. *et al.* (2002) 'Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), pp. 12877–12882. doi: 10.1073/pnas.162488599.

Chen, C. *et al.* (2005) 'Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR', *Nucleic Acids Research*, 33(20), pp. e179–e179. doi: 10.1093/nar/gni178.

Cheong, A. *et al.* (2005) 'Downregulated REST Transcription Factor Is a Switch Enabling Critical Potassium Channel Expression and Cell Proliferation', *Molecular Cell*, 20(1), pp. 45–52. doi: 10.1016/j.molcel.2005.08.030.

Chesi, M. *et al.* (1997) 'Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3', *Nature Genetics*, 16(3), pp. 260–264. doi: 10.1038/ng0797-260.

Chesi, M. *et al.* (1998) 'The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts', *Blood*, 92(9), pp. 3025–3034.

Cimmino, A. *et al.* (2005) 'miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), pp. 13944–13949. doi: 10.1073/pnas.0506654102.

Corbetta, S. *et al.* (2010) 'Differential expression of microRNAs in human parathyroid carcinomas compared with normal parathyroid tissue', *Endocrine-Related Cancer*, 17(1), pp. 135–146. doi: 10.1677/ERC-09-0134.

Cui, Y.-H. *et al.* (2012) 'miR-503 represses CUG-binding protein 1 translation by recruiting CUGBP1 mRNA to processing bodies', *Molecular Biology of the Cell*, 23(1), pp. 151–162. doi: 10.1091/mbc.E11-05-0456.

Deutsche Gesellschaft für Nephrologie (2014) *Deutsche Gesellschaft für Nephrologie - Das Nierenportal: Daten und Fakten zur Nephrologie*. Available at: <http://www.dgfn.eu/presse/downloadbereich/daten-und-fakten-zur-nephrologie.html> (Accessed: 25 May 2016).

Di, L. *et al.* (2010) 'Inhibition of the K<sup>+</sup> channel KCa3.1 ameliorates T cell-mediated colitis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), pp. 1541–1546. doi: 10.1073/pnas.0910133107.

Dono, R. *et al.* (1998) 'Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice', *The EMBO journal*, 17(15), pp. 4213–4225. doi: 10.1093/emboj/17.15.4213.

- Dutta, A. K. *et al.* (2009) 'Identification and functional characterization of the intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel (IK-1) in biliary epithelium', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(5), pp. G1009–G1018. doi: 10.1152/ajpgi.00223.2009.
- Eddy, A. A. (2000) 'Molecular basis of renal fibrosis', *Pediatric nephrology*, 15(3–4), pp. 290–301.
- Eswarakumar, V. P., Lax, I. and Schlessinger, J. (2005) 'Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors', *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 16(2), pp. 139–149. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.001.
- European Renal Association (2008) *AnnRep2008.pdf, Annual Report 2008*. Available at: <http://www.era-edta-reg.org/files/annualreports/pdf/AnnRep2008.pdf> (Accessed: 9 November 2011).
- Fanger, C. M. *et al.* (1999) 'Calmodulin Mediates Calcium-dependent Activation of the Intermediate Conductance  $\text{KCa}$  Channel,  $\text{IKCa1}$ ', *Journal of Biological Chemistry*, 274(9), pp. 5746–5754. doi: 10.1074/jbc.274.9.5746.
- Fern, R. J. *et al.* (1999) 'Reduced angiotensinogen expression attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy in mice', *Journal of Clinical Investigation*, 103(1), pp. 39–46.
- Fire, A. *et al.* (1998) 'Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*', *Nature*, 391(6669), pp. 806–811. doi: 10.1038/35888.
- Forrest, A. R. R. *et al.* (2009) 'Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation', *Leukemia*, 24(2), pp. 460–466. doi: 10.1038/leu.2009.246.
- Förster, Th. (1948) 'Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz', *Annalen der Physik*, 437(1–2), pp. 55–75. doi: 10.1002/andp.19484370105.
- Friedman, R. C. *et al.* (2009) 'Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs', *Genome Research*, 19(1), pp. 92–105. doi: 10.1101/gr.082701.108.
- Garcia, D. M. *et al.* (2011) 'Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsy-6 and other microRNAs', *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(10), pp. 1139–1146. doi: 10.1038/nsmb.2115.
- Gardos, G. (1958) 'The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 30(3), pp. 653–654.
- Gerlier, D. and Thomasset, N. (1986) 'Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation', *Journal of Immunological Methods*, 94(1–2), pp. 57–63. doi: 10.1016/0022-1759(86)90215-2.

Gesundheitsbericht des Bundes (GBE) (2016) *Dialysepatienten*. Available at: [http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd\\_init?gbe.isgbetol/xs\\_start\\_neu/&p\\_aid=3&p\\_aid=45078442&nummer=427&p\\_sprache=D&p\\_indsp=99999999&p\\_aid=44558689#SOURCE](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=45078442&nummer=427&p_sprache=D&p_indsp=99999999&p_aid=44558689#SOURCE) S (Accessed: 26 May 2016).

Grgic, I. (2005) 'Die Rolle der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{K}^{+}$ -Kanäle bei Endothelzellproliferation und Angiogenese'. Available at: <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2006/0475/> (Accessed: 5 April 2016).

Grgic, I. *et al.* (2005) 'Selective Blockade of the Intermediate-Conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -Activated  $\text{K}^{+}$  Channel Suppresses Proliferation of Microvascular and Macrovascular Endothelial Cells and Angiogenesis In Vivo', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(4), pp. 704–709. doi: 10.1161/01.ATV.0000156399.12787.5c.

Grgic, I. *et al.* (2009) 'Renal fibrosis is attenuated by targeted disruption of  $\text{KCa}3.1$  potassium channels', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), pp. 14518–14523. doi: 10.1073/pnas.0903458106.

Grgic, I., Duffield, J. S. and Humphreys, B. D. (2011) 'The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease', *Pediatric Nephrology*. doi: 10.1007/s00467-011-1772-6.

Grimson, A. *et al.* (2007) 'MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing', *Molecular Cell*, 27(1), pp. 91–105. doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.017.

Grissmer, S., Nguyen, A. N. and Cahalan, M. D. (1993) 'Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology', *The Journal of General Physiology*, 102(4), pp. 601–630. doi: 10.1085/jgp.102.4.601.

Guo, J., Liu, X. and Wang, M. (2011) 'miR-503 suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting RNF31 in prostate cancer', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.127.

Hamill, O. P. *et al.* (1981) 'Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches', *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 391(2), pp. 85–100.

Hayashi, M. *et al.* (2012) 'An intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel is important for secretion in pancreatic duct cells', *American journal of physiology. Cell physiology*, 303(2), pp. C151–159. doi: 10.1152/ajpcell.00089.2012.



Hewitson, T. D. and Becker, G. J. (1995) 'Interstitial myofibroblasts in IgA glomerulonephritis', *American Journal of Nephrology*, 15(2), pp. 111–117.

Hoher, B. *et al.* (1997) 'Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension.', *Journal of Clinical Investigation*, 99(6), pp. 1380–1389.

Humphreys, B. D. *et al.* (2010) 'Fate Tracing Reveals the Pericyte and Not Epithelial Origin of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis', 176(1), pp. 85–97. doi: 10.2353/ajpath.2010.090517.

Hutvagner, G. *et al.* (2001) 'A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA', *Science*, 293(5531), pp. 834–838. doi: 10.1126/science.1062961.

Ina, K. *et al.* (2002) 'Transformation of interstitial fibroblasts and tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy', *Medical Electron Microscopy*, 35, pp. 87–95. doi: 10.1007/s007950200011.

Iwano, M. *et al.* (2002) 'Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis', *Journal of Clinical Investigation*, 110, pp. 341–350. doi: 10.1172/JCI15518.

Johnson, D. W. *et al.* (1998) 'Paracrine stimulation of human renal fibroblasts by proximal tubule cells', *Kidney Int*, 54(3), pp. 747–757.

Kalluri, R. and Zeisberg, M. (2006) 'Fibroblasts in cancer', *Nat Rev Cancer*, 6(5), pp. 392–401. doi: 10.1038/nrc1877.

Khanna, R. *et al.* (1999) 'hSK4/hIK1, a Calmodulin-binding KCa Channel in Human T Lymphocytes ROLES IN PROLIFERATION AND VOLUME REGULATION', *Journal of Biological Chemistry*, 274(21), pp. 14838–14849. doi: 10.1074/jbc.274.21.14838.

Kondo, S. *et al.* (2001) 'Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis', *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(8), pp. 1668–1676.

Kopp, J. B. *et al.* (1996) 'Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease', *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 74(6), pp. 991–1003.

Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S. (2011) 'miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data', *Nucleic Acids Research*, 39(suppl 1), pp. D152–D157. doi: 10.1093/nar/gkq1027.

Krek, A. *et al.* (2005) 'Combinatorial microRNA target predictions', *Nature Genetics*, 37(5), pp. 495–500. doi: 10.1038/ng1536.

- Kriz, W. *et al.* (1995) 'Long-term treatment of rats with FGF-2 results in focal segmental glomerulosclerosis', *Kidney International*, 48(5), pp. 1435–1450.
- Kwan, C.-Y. *et al.* (2010) 'New perspectives on vascular wall signaling: role of perivascular adipocytes and fibroblasts', *Acta Pharmacol Sin*, 31(9), pp. 1022–1025.
- Lagos-Quintana, M. *et al.* (2001) 'Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs', *Science*, 294(5543), pp. 853–858. doi: 10.1126/science.1064921.
- Lameire, N. *et al.* (2005) 'Chronic kidney disease: A European perspective', *Kidney Int*, 68(S99), pp. S30–S38.
- Lau, N. C. *et al.* (2001) 'An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*', *Science*, 294(5543), pp. 858–862. doi: 10.1126/science.1065062.
- Ledoux, J. *et al.* (2006) 'Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone', *Physiology*, 21(1), pp. 69–78. doi: 10.1152/physiol.00040.2005.
- Lee, P. L. *et al.* (1989) 'Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor', *Science*, 245(4913), pp. 57–60.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. and Ambros, V. (1993) 'The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*', *Cell*, 75(5), pp. 843–854.
- Lee, Y. *et al.* (2003) 'The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing', *Nature*, 425(6956), pp. 415–419. doi: 10.1038/nature01957.
- Levey, A. S. *et al.* (2003) 'National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification', *Annals of Internal Medicine*, 139(2), pp. 137–147.
- Lewis, B. P. *et al.* (2003) 'Prediction of Mammalian MicroRNA Targets', *Cell*, 115(7), pp. 787–798. doi: 10.1016/S0092-8674(03)01018-3.
- Lewis, B. P., Burge, C. B. and Bartel, D. P. (2005) 'Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets', *Cell*, 120(1), pp. 15–20. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.035.
- Lewis, R. S. and Cahalan, M. D. (1995) 'Potassium and calcium channels in lymphocytes', *Annual review of immunology*, 13(1), pp. 623–653.
- Li, B. *et al.* (2015) 'miR-503 suppresses metastasis of hepatocellular carcinoma cell by targeting PRMT1', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.169.

- Liu, L., Qu, W. and Zhong, Z. (2015) 'Down-regulation of miR-503 expression predicate advanced mythological features and poor prognosis in patients with NSCLC', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(5), pp. 5609–5613.
- Liu, Q. *et al.* (2008) 'miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes', *Nucleic Acids Research*, 36(16), pp. 5391–5404. doi: 10.1093/nar/gkn522.
- Llobet-Navas, D. *et al.* (2014) 'The miR-424(322)/503 cluster orchestrates remodeling of the epithelium in the involuting mammary gland', *Genes & Development*, 28(7), pp. 765–782. doi: 10.1101/gad.237404.114.
- Logsdon, N. J. *et al.* (1997) 'A Novel Gene, hKCa4, Encodes the Calcium-activated Potassium Channel in Human T Lymphocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 272(52), pp. 32723–32726. doi: 10.1074/jbc.272.52.32723.
- Long, J. *et al.* (2015) 'MiR-503 inhibited cell proliferation of human breast cancer cells by suppressing CCND1 expression', *Tumor Biology*, pp. 1–6. doi: 10.1007/s13277-015-3623-8.
- Makni, K. *et al.* (2009) 'Renal  $\alpha$ -smooth muscle actin: A new prognostic factor for lupus nephritis', *Nephrology*, 14(5), pp. 499–505. doi: 10.1111/j.1440-1797.2009.01140.x.
- Mosmann, T. (1983) 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays', *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), pp. 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Mourelatos, Z. *et al.* (2002) 'miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs', *Genes & Development*, 16(6), pp. 720–728. doi: 10.1101/gad.974702.
- Muller, G. *et al.* (1992) 'The role of interstitial cells in the progression of renal diseases', *Journal of the American Society of Nephrology*, 2(10), pp. S198–S205.
- Neher, E. and Sakmann, B. (1976) 'Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres', *Nature*, 260(5554), pp. 799–802.
- Nilius, B. and Droogmans, G. (2001) 'Ion Channels and Their Functional Role in Vascular Endothelium', *Physiological Reviews*, 81(4), pp. 1415–1459.
- Okada, H. *et al.* (2000) 'Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: An immunohistochemical observation', *Kidney Int*, 58(2), pp. 587–597.
- Özata, D. M. *et al.* (2011) 'The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma', *Endocrine-Related Cancer*, 18(6), pp. 643–655. doi: 10.1530/ERC-11-0082.

Peña, T. L. *et al.* (2000) 'Ras/MEK/ERK Up-regulation of the Fibroblast K<sub>Ca</sub>Channel FIK Is a Common Mechanism for Basic Fibroblast Growth Factor and Transforming Growth Factor- $\beta$  Suppression of Myogenesis', *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), pp. 13677–13682. doi: 10.1074/jbc.275.18.13677.

Peña, T. L. and Rane, S. G. (1999) 'The Fibroblast Intermediate Conductance K<sub>Ca</sub> Channel, FIK, as a Prototype for the Cell Growth Regulatory Function of the IK Channel Family', *Journal of Membrane Biology*, 172, pp. 249–257. doi: 10.1007/s002329900601.

Peng, Y. *et al.* (2014) 'microRNA-503 inhibits gastric cancer cell growth and epithelial-to-mesenchymal transition', *Oncology Letters*, 7(4), pp. 1233–1238. doi: 10.3892/ol.2014.1868.

Reinhart, B. J. *et al.* (2000) 'The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*', *Nature*, 403(6772), pp. 901–906. doi: 10.1038/35002607.

Risdon, R. A., Sloper, J. C. and De Wardener, H. E. (1968) 'Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis', *The Lancet*, 292(7564), pp. 363–366. doi: 10.1016/S0140-6736(68)90589-8.

Rissland, O. S., Hong, S.-J. and Bartel, D. P. (2011) 'MicroRNA Destabilization Enables Dynamic Regulation of the miR-16 Family in Response to Cell Cycle Changes', *Molecular cell*, 43(6), pp. 993–1004. doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.021.

Ross, R., Everett, N. B. and Tyler, R. (1970) 'WOUND HEALING AND COLLAGEN FORMATION', *The Journal of Cell Biology*, 44(3), pp. 645–654.

Sarabipour, S. and Hristova, K. (2016) 'Mechanism of FGF receptor dimerization and activation', *Nature Communications*, 7, p. 10262. doi: 10.1038/ncomms10262.

Sarkar, S., Dey, B. K. and Dutta, A. (2010) 'MiR-322/424 and -503 Are Induced during Muscle Differentiation and Promote Cell Cycle Quiescence and Differentiation by Down-Regulation of Cdc25A', *Molecular Biology of the Cell*, 21(13), pp. 2138–2149. doi: 10.1091/mbc.E10-01-0062.

Sauvé, R. *et al.* (1990) 'Single-channel analysis of the electrical response of bovine aortic endothelial cells to bradykinin stimulation: contribution of a Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent K<sup>+</sup> channel.', *Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension*, 8(7), pp. S193-201.

Schwarz, D. S. *et al.* (2003) 'Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex', *Cell*, 115(2), pp. 199–208. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00759-1.

- Shao, Z., Makinde, T. O. and Agrawal, D. K. (2011) 'Calcium-Activated Potassium Channel KCa3.1 in Lung Dendritic Cell Migration', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 45(5), pp. 962–968. doi: 10.1165/rcmb.2010-05140C.
- Shepherd, M. C. *et al.* (2007) 'KCa3.1 Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels regulate human airway smooth muscle proliferation', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 37(5), pp. 525–531. doi: 10.1165/rcmb.2006-03580C.
- Shi, Y. and Massagué, J. (2003) 'Mechanisms of TGF- $\beta$  Signaling from Cell Membrane to the Nucleus', *Cell*, 113(6), pp. 685–700. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00432-X.
- Si, H. *et al.* (2006) 'Mitogenic modulation of Ca<sup>2+</sup> -activated K<sup>+</sup> channels in proliferating A7r5 vascular smooth muscle cells', *British journal of pharmacology*, 148(7), pp. 909–917. doi: 10.1038/sj.bjp.0706793.
- Singh, S. *et al.* (2001) 'Benzimidazolone Activators of Chloride Secretion: Potential Therapeutics for Cystic Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(2), pp. 600–611.
- Strøbæk, D. *et al.* (2004) 'Activation of human IK and SK Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by NS309 (6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione 3-oxime)', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1665(1–2), pp. 1–5. doi: 10.1016/j.bbamem.2004.07.006.
- Strutz, F. *et al.* (1995) 'Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1', *The Journal of Cell Biology*, 130(2), pp. 393–405. doi: 10.1083/jcb.130.2.393.
- Strutz, F. *et al.* (2000) 'Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation', *Kidney Int*, 57(4), pp. 1521–1538.
- Strutz, F. *et al.* (2001) 'TGF-[bgr]1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2)', *Kidney Int*, 59(2), pp. 579–592.
- Strutz, F. and Neilson, E. G. (1994) 'The role of lymphocytes in the progression of interstitial disease', *Kidney International. Supplement*, 45, pp. S106–110.
- Strutz, F. and Neilson, E. G. (2003) 'New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury', *Springer Seminars in Immunopathology*, 24, pp. 459–476. doi: 10.1007/s00281-003-0123-5.
- Strutz, F. and Zeisberg, M. (2006) 'Renal Fibroblasts and Myofibroblasts in Chronic Kidney Disease', *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(11), pp. 2992–2998. doi: 10.1681/ASN.2006050420.

Ilstyt, T. D. and Hein, P. W. (2001) 'Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals', *Current Opinion in Genetics & Development*, 11(1), pp. 54–59. doi: 10.1016/S0959-437X(00)00156-8.

Tomasek, J. J. *et al.* (2002) 'Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(5), pp. 349–363. doi: 10.1038/nrm809.

UCSC (2014) *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly: Bindungsstelle miR-503 in der 3'UTR des RAF1 Gens., USCS Genome Browser.* Available at: [http://genome.ucsc.edu/trash/hgt/hgt\\_genome\\_2fc7\\_757f90.png](http://genome.ucsc.edu/trash/hgt/hgt_genome_2fc7_757f90.png) (Accessed: 29 May 2014).

Virchow, R. (1859) *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre: zwanzig Vorlesungen, gehalten während der Monate Februar, März und April 1858 im pathologischen Institute zu Berlin.* Berlin: Hirschwald.

Wang, L.-P. *et al.* (2013) 'Angiotensin II upregulates KCa3.1 channels and stimulates cell proliferation in rat cardiac fibroblasts', *Biochemical Pharmacology*, 85(10), pp. 1486–1494. doi: 10.1016/j.bcp.2013.02.032.

Wang, T. *et al.* (2014) 'MiR-503 regulates cisplatin resistance of human gastric cancer cell lines by targeting IGF1R and BCL2', *Chinese Medical Journal*, 127(12), pp. 2357–2362.

Whitehead Institute for Biomedical Research (2013) *TargetscanHuman 6.2: predicted miRNA targets of miR-503, TargetScan Release 6.2.* Available at: [http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert\\_61/targetscan.cgi?species=Mouse&gid=&mir\\_sc=miR-503&mir\\_c=&mir\\_nc=&mirg=](http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_61/targetscan.cgi?species=Mouse&gid=&mir_sc=miR-503&mir_c=&mir_nc=&mirg=) (Accessed: 12 August 2013).

Wong, L. *et al.* (2007) *Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan® MicroRNA Assays.* Available at: <http://www.gene-quantification.de/AB-microRNA-endog-controls.pdf> (Accessed: 11 July 2012).

Wulff, H. *et al.* (2000) 'Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, IKCa1: A potential immunosuppressant', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), pp. 8151–8156.

Wulff, H. *et al.* (2001) 'Delineation of the Clotrimazole/TRAM-34 Binding Site on the Intermediate Conductance Calcium-activated Potassium Channel, IKCa1', *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), pp. 32040–32045. doi: 10.1074/jbc.M105231200.

Xiao, F. *et al.* (2013) 'MicroRNA-503 inhibits the G1/S transition by downregulating cyclin D3 and E2F3 in hepatocellular carcinoma', *Journal of Translational Medicine*, 11, p. 195. doi: 10.1186/1479-5876-11-195.

Xu, Y.-Y. *et al.* (2013) 'MicroRNA-503 suppresses proliferation and cell-cycle progression of endometrioid endometrial cancer by negatively regulating cyclin D1', *FEBS Journal*, 280(16), pp. 3768–3779. doi: 10.1111/febs.12365.

Yoshimatsu, M. *et al.* (2011) 'Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers', *International Journal of Cancer*, 128(3), pp. 562–573. doi: 10.1002/ijc.25366.

Yu, F. H. *et al.* (2005) 'Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily', *Pharmacological Reviews*, 57(4), pp. 387–395. doi: 10.1124/pr.57.4.13.

Zeisberg, E. M. *et al.* (2008) 'Fibroblasts in Kidney Fibrosis Emerge via Endothelial-to-Mesenchymal Transition', *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(12), pp. 2282–2287. doi: 10.1681/ASN.2008050513.

Zhang, K. *et al.* (1994) 'Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study', *The American Journal of Pathology*, 145(1), pp. 114–125.

Zhao, J.-J. *et al.* (2008) 'Identification of miRNAs associated with tumorigenesis of retinoblastoma by miRNA microarray analysis', *Child's Nervous System*, 25(1), pp. 13–20. doi: 10.1007/s00381-008-0701-x.

Zhou, B. *et al.* (2013) 'MicroRNA-503 targets FGF2 and VEGFA and inhibits tumor angiogenesis and growth', *Cancer Letters*, 333(2), pp. 159–169. doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.028.

Zhu, H. *et al.* (2012) 'MicroRNA expression abnormalities in limited cutaneous scleroderma and diffuse cutaneous scleroderma', *Journal of clinical immunology*, 32(3), pp. 514–522. doi: 10.1007/s10875-011-9647-y.

## Publikation

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

**Mann C. et al. Downregulation of miR-503 in Activated Kidney Fibroblasts Disinhibits KCNN4 in an *in Vitro* Model of Kidney Fibrosis**

Kidney Blood Press Res 2019;44:113–122

<https://doi.org/10.1159/000498875>

## Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Adamkiewicz	Bien	Foth	Höffken
Arenius	Brehm	Geks	Hofmann
Aumüller	Cetin	Gemsa	Höglinger
Barth	Czubayko	Gerdes	Horn
Bartsch	Daut	Glorius	Hoyer
Basler	Del Rey	Görg	Kalinowski
Bauer	Dietrich	Gress	Kann
Baum	Donner- Banzhoff	Grimm	Kaufmann
Bauman	Eberhart	Grundmann	Kerzel
Baumann	Eilers	Grzeschik	Kill
Becker	Fendrich	Hasilik	Klenk
Berger	Feuser	Hegele	Klose
Bette		Hertl	Köhler



Koolman	Moosdorf	Rölke	Tackenberg
Krebber	Mueller	Röper	Vogelmeyer
Kroll	Müller	Rosenow	Voigt
Krones	Mutters	Rothmund	Wagner
Kuhlmann	Neubauer	Ruchholtz	Waldegger
Langer	Neumüller	Schade	Weihe
Lehr	Nimphius	Schäfer	Wennemuth
Lill	Oertel	Schmidt	Werner
Liss	Olbert	Schofer	Westermann
Löffler	Opitz	Schrader	Wiegand
Lohoff	Pagenstecher	Schulz	Wilhelm
Maier	Plant	Schultze	Wulff
Maisch	Ramaswamy	Seitz	Yu
Mandrek	Rausch	Sesterhenn	Zemlin
Martin	Renz	Sommer	
Meyer	Richter	Sönnichsen	
Mittag	Risse	Steiniger	
Moll	Röhm	Strauß	

## Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die tatkräftige Hilfe und Unterstützung vieler Freunde, Kollegen und Familienmitglieder nicht zustande gekommen. Stellvertretend für alle, die mich während der Zeit im Labor und der späteren Literaturarbeit unterstützt haben, danke ich besonders:

Meinem Doktorvater Prof. Joachim Hoyer, für die Idee und den Mut zur Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Infrastruktur und Materialien, die tiefgründigen, ansteckenden und manchmal emotionalen Diskussionen, seinen Weitblick und seine Geduld, diese Arbeit mit mir zu Ende zu führen.

Dr. Brajesh Pratap Kaistha und Dr. Anuradha Kaistha für die Betreuung, die oft zeitintensive Ausbildung in den Labortechniken und dem wissenschaftlichen Arbeiten, Ihrer Beharrungsfähigkeit und der Ansteckung mit der Freude am Forschen.

Für die gute Zusammenarbeit, die Ausbildung, die vielen kleinen Hilfen oder Gespräche an den schweren Tagen danke ich Michael Kacik, Felix Kurtz, Michael Krause, Sigrid Bischofsberger, Ivica Grgic, Anette Glockner, Thorsten Stiewe und allen weiteren, mit denen ich das Glück hatte in diesen Jahren zusammenzuarbeiten.

Für die viel zu selten gewordenen Worte und Diskussionen, Abende und Nächte, für die Freiheit des Geistes und ihre besondere Freundschaft danke ich den *Möckmühlern*, ganz besonders Volker, Mathias, Marcus, Dominik, Philip, Michael und Paul. Hoffentlich auf Bald!

Besonders danken möchte ich meinen Eltern Gertrud und Horst Mann für ihre immerwährende und uneingeschränkte Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meiner Frau Verena danke ich für Ihre Geduld, für die Unterstützung zu Zeiten, in denen diese Arbeit so viel Raum einnahm, dass wenig Zeit für anderes blieb. Danke für deine Liebe, die Motivation und die Hilfe, diese Arbeit zu Ende zu führen.

Danke meinen wundervollen Kindern Orpheas und Elias für eure ansteckende Neugier, eure Begeisterung und eure Gnadenlosigkeit.